

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή εργασία

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΧΥΜΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

Κρίστια Καρολίνα Μενοικέα

Λεμεσός 2016

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

Πτυχιακή εργασία

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΧΥΜΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

Κρίστια Καρολίνα Μενοικέα

Σύμβουλος καθηγητής
Δρ. Μιχάλης Κουτίνας

Λεμεσός 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Κρίστια Καρολίνα Μενουκιά2016

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.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Προπτυχιακού Προγράμματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2015- 2016.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Μιχάλη Κουτίνα για το ενδιαφέρον που έδειξε και την εμπιστοσύνη που με περιέβαλε κατά την διάρκεια της εκπλήρωσης της έρευνας αυτής.

Παράλληλα ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Πάτσαλου για το μεγάλο ενδιαφέρον που έδειξε σε μένα, την συνεχή της καθοδήγηση, τις γνώσεις τις οποίες μου μετέδωσε και γενικά την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφερε κατά την διάρκεια ολοκλήρωσης της πτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεργασία που αναπτύχθηκε κατά την διάρκεια παρουσίας μου στα εργαστήρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος με τους παρόντες συναδέλφους και συμφοιτητές καθώς και το ίδιο το τμήμα για την δυνατότητα πρόσβασης που μου παρείχε στις διάφορες εγκαταστάσεις του κατά την διάρκεια της εργασίας μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ ψυχής την οικογένεια μου για την αγάπη και συμβουλές που μου δίνουν συνεχώς και βρίσκονται πάντα στο πλευρό μου στηρίζοντας με.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φλούδες από απόβλητα εσπεριδοειδών μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή υδατανθράκων για την κατανάλωση τους από μικροοργανισμούς με σκοπό την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων. Στην παρούσα εργαστηριακή πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και άλλων οργανικών οξέων (φορμικό, γαλακτικό και οξικό οξύ) τα οποία παράγονται κατά τον μεταβολισμό του μικροοργανισμού *Actinobacillus succinogenes* μέσω της ζύμωσης σακχάρων τα οποία εμπεριέχονται σε απόβλητα φλουδών εσπεριδοειδών ποικιλίας «μάντορες». Για την επίτευξη της παραγωγής πραγματοποιήθηκε μια σειρά φυσικοχημικών και βιολογικών διεργασιών οι οποίες περιλάμβαναν απομάκρυνση αιθέριων ελαίων και πηκτίνης καθώς και όξινη υδρόλυση, που σκοπό είχαν την προετοιμασία των φλουδών για την διάσπαση την κυτταρίνης και ημικυτταρίνης που εμπεριέχονται, σε απλούστερα ζυμώσιμα σάκχαρα, για επιτυχή ζύμωση και παραγωγή των επιθυμητών προϊόντων. Ο όγκος εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε στις ζυμώσεις ήταν 13 % σε θερμοκρασία ανάπτυξης 37° C.

Οι μέγιστες αποδόσεις παραγωγής ηλεκτρικού οξέος μετά από μια σειρά πειραμάτων ζύμωσης σακχάρων τα οποία προέρχονταν από διαφορετικές συνθήκες προεπεξεργασίας με όξινη υδρόλυση επιτεύχθηκαν για συνθήκες θερμοκρασίας 109° C, χρόνου 20 λεπτών και ποσοστό στερεής μάζας 5 % και 116° C, χρόνου 10 λεπτών και ποσοστό στερεής μάζας 5 %. Η απόδοση παραγωγής ηλεκτρικού οξέος ήταν 0,76 g ηλεκτρικού οξέος / g στερεής μάζας και 0,77 g ηλεκτρικού οξέος / g στερεής μάζας αντίστοιχα. Επιπλέον οι αποδόσεις παραγωγής συνολικών οργανικών οξέων είναι αντίστοιχα 1,26 g οργανικών οξέων / g στερεής μάζας και 1,20 g οργανικών οξέων / g στερεής μάζας.

Επιπρόσθετα κατά τις όξινες υδρολύσεις της ξηρής μάζας φλουδών παρατηρείται μεγαλύτερη απελευθέρωση σακχάρων σε συνθήκες 109° C, για χρόνο 10 λεπτά και 10 % ξηρή μάζα φλούδας με την συγκέντρωση απελευθέρωσης σακχάρων να είναι 0,4333 g/L.

Λέξεις κλειδιά: ηλεκτρικό οξύ, φορμικό οξύ, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, *Actinobacillus succinogenes*, αναερόβιες συνθήκες

ABSTRACT

The citrus peels waste can be an important source of carbohydrates for microorganism consumption to produce useful products. This laboratory thesis, has studied the production of succinic acid and other organic acids (formic, lactic and acetic acid) which are produced from the metabolism of the microorganism *Actinobacillus succinogenes* via fermentation of sugars which are contained in peels of citrus waste variety 'mantores'. To achieve the output a number of physicochemical and biological processes were held, which included removal of essential oils and pectin and acid hydrolysis, which were intended to prepare the hull for the decomposition of cellulose and hemicellulose contained in simpler fermentable sugars for successful fermentation and desired products. The volume of the inoculum used in the fermentation was 13% growth at temperature 37° C.

Maximum yields of succinic acid production after a series of sugar fermentation experiments which originated different pretreatment conditions by acid hydrolysis obtained for temperatures 109° C, time 20 minutes and rate of solid mass 5 %, and for 116° C, time of 10 minutes and rate of solid mass 5 %. The succinic acid yield was 0.76 $\text{g}_{\text{succinic acid}} / \text{g}_{\text{total sugars}}$ and 0.77 $\text{g}_{\text{succinic acid}} / \text{g}_{\text{total sugars}}$ respectively. Moreover, the total production yields of the organic acids are respectively 1.26 $\text{g}_{\text{organic acids}} / \text{g}_{\text{solid mass}}$ and 1.20 $\text{g}_{\text{organic acids}} / \text{g}_{\text{solid mass}}$. In addition, during the acid hydrolysis of the mass of the dry waste peel most sugar release occurs under conditions of 109° C, for 10 minutes and 10% solid mass with a concentration release of 0,4333 g / L.

Keywords: succinic acid, formic acid, lactic acid, acetic acid, *Actinobacillus succinogenes*, anaerobical conditions

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT	v
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	x
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xii
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	xiii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	xiv
1 Εσπεριδοειδή.....	1
1.1 Απόβλητα φλούδας εσπεριδοειδών	1
1.2 Σύνθεση φλούδας εσπεριδοειδών.....	1
1.3 Μέθοδοι αξιοποίησης.....	2
1.3.1 Ζωοτροφές.....	2
1.3.2 Οργανικό λίπασμα	2
1.4 Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας και βιοκαυσίμων	3
1.4.1 Αιθέρια έλαια και D - λιμονένιο.....	3
1.4.2 Πηκτίνη.....	3
1.4.3 Βιοαιθανόλη	4
1.4.4 Μεθάνιο	4
1.4.5 Βιομηχανικά ένζυμα.....	5
1.4.6 Μικροβιακή πρωτεΐνη και κιτρικό οξύ.....	5
1.5 Βιοδυλιστήριο	5
1.6 Ηλεκτρικό οξύ	6
1.6.1 Πληροφορίες.....	6

1.6.2	Εφαρμογές και χρήσεις.....	6
1.6.3	Παραδοσιακές και βιοτεχνολογικές μέθοδοι παραγωγής.....	7
1.6.4	Παραγωγοί ηλεκτρικού οξέος	8
1.7	Μικροοργανισμοί	10
1.7.1	<i>Actinobacillus succinogenes</i>	10
1.7.2	<i>Trichoderma reesei</i>	11
2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	12
2.1	Φυσικοχημική επεξεργασία φλουδών εσπεριδοειδών και μικροβιακή ζύμωση για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και άλλων οργανικών.....	12
2.2	Πρώτη ύλη.....	13
2.3	Προεπεξεργασία	13
2.3.1	Προετοιμασία φλουδών – Τεμαχισμός.....	13
2.3.2	Εξαγωγή και συλλογή αιθέριων ελαίων και Δ-λιμονένιου	13
2.3.3	Όξινη υδρόλυση ημικυτταρίνης και κυτταρίνης	13
2.3.4	Συλλογή και ανάκτηση πηκτίνης.....	15
2.4	Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος	15
2.4.1	2.4.1 Μικροβιακές ζυμώσεις.....	15
2.4.2	Ανάπτυξη μικροοργανισμού <i>Actinobacillus succinogenes</i>	15
2.4.3	Προετοιμασία ζύμωσης.....	16
2.5	Ανάπτυξη μικροοργανισμού <i>Trichoderma reesei</i>	16
2.6	Μέθοδοι ανάλυσης	17
2.6.1	Διαδικασία λήψης δείγματος.....	17
2.6.2	Χρωματομετρικός Προσδιορισμός Ολικών Σακχάρων – Μέθοδος Dubois	17
2.6.3	Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας- Μέθοδος Ghose.....	18
2.6.4	Φασματομετρία Μοριακής Απορρόφησης στο Υπεριώδες/ Ορατό (UV/Vis)..	19
2.6.5	Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	19

3	ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	21
3.1	Όξινες υδρολύσεις.....	21
3.2	Ζυμώσεις.....	22
3.3	Παραγωγή οργανικών οξέων.....	32
3.4	Κατανάλωση Σακχάρων.....	34
3.5	Απόδοση παραγωγή οργανικών οξέων.....	35
3.6	Ανάπτυξη μικροοργανισμού <i>Trichoderma reesei</i>	36
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	38
	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	39
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	40

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Αποδόσεις και συγκεντρώσεις παραγωγής ανάλογα με το υπόστρωμα και χρήση διαφορετικών στελεχών	9
Πίνακας 2: Πίνακας πειραμάτων συνθηκών όξινης υδρόλυση και ζύμωσης.....	14
Πίνακας 3: Πίνακας συνθηκών και ποσοτήτων μέγιστης παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και συνολικών οργανικών οξέων.....	33

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης γλυκόζης.....	18
Διάγραμμα 2 :Καμπύλη βαθμονόμησης α) ηλεκτρικού οξέος β) φορμικού και γαλακτικού οξέος γ) οξικού οξέος.....	20
Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση συγκέντρωσης σακχάρων σε υδρολύματα διαφορετικών συνθηκών όξινης υδρόλυσης.....	21
Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση απόδοσης συνολικής απελευθέρωσης υδατανθράκων ανά γραμμάριο ξηρής μάζας μετά από όξινες υδρόλυσεις διαφορετικών συνθηκών	22
Διάγραμμα 5: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 10 min, 5 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητας μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH.....	24
Διάγραμμα 6: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 10 min, 10 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητας μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH.....	25
Διάγραμμα 7: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 20 min, 5 % στερεής μάζα α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητας μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH.....	26
Διάγραμμα 8: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 20 min, 10 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητας μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH.....	27
Διάγραμμα 9: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 116° C, 10 min, 5 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητας μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH.....	28

Διάγραμμα 10: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 10 min, 10 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητας μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH.....	29
Διάγραμμα 11: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 20 min, 5 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητας μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH.....	30
Διάγραμμα 12: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 20 min, 10 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητας μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH.....	31
Διάγραμμα 13: Γραφική παράσταση μέγιστων συγκεντρώσεων παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και συνολικών οργανικών οξέων για τις διάφορες συνθήκες όξινης υδρόλυσης κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων των υδρολυμάτων	34
Διάγραμμα 14: Γραφική παράσταση σύγκρισης κατανάλωσης σακχάρων κατά τα πειράματα ζυμώσεων	35
Διάγραμμα 15: Γραφική παράσταση απόδοσης ηλεκτρικού οξέος και άλλων οργανικών για τα διάφορα πειράματα ζυμώσεων	36
Διάγραμμα 16:Γραφική παράσταση ενζυμική δραστηριότητα του μικροοργανισμού <i>T. reseei</i> σε σχέση με το χρόνο	37

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CO_2 :	Διοξείδιο του άνθρακα
MgCO_3 :	Ανθρακικό μαγνήσιο
FPU:	Filter paper units
NaOH :	Υδροξείδιο του νατρίου
H_2SO_4 :	Θεικό οξύ
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:	Επταένυδρο θεικό μαγνήσιο
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:	Θεικό αμμώνιο
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:	Διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο
$\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$:	Δισόξινο φωσφορικό νάτριο
mg	Χιλιοστόγραμμα

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

Tryptone Soya Broth	Τρυπτικός ζωμός σόγιας
Glucose	Γλυκόζη
Yeast Extract	Εκχύλισμα ζύμης
Wheat bran	Πίτουρο σιταριού
Avicel	Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη
Peptone	Πεπτόνη
Tween – 80	Πολυσκορβικό – 80
Minute	Λεπτό
Anaerobic batch	Αναερόβιος αντιδραστήρας
Aeration batch	Αεριζόμενος αντιδραστήρας
Sparging batch reactor	Κλειστός βιοαντιδραστήρας ψεκασμού

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παγκόσμια παραγωγή εσπεριδοειδών έχει βιώσει τις τελευταίες δεκαετίες ραγδαία αύξηση, κυρίως στη Μεσόγειο όπως η Ιταλία, Ισπανία όπως και σε άλλες χώρες όπως είναι η Βραζιλία οι Ηνωμένες Πολιτείες και η Κίνα. Τα πορτοκάλια αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος παγκόσμιας παραγωγής. Ένα μεγάλο μέρος της παραγωγής των εσπεριδοειδών οδηγείται σε βιομηχανική επεξεργασία για παρασκευή χυμών και άλλων χρήσιμων προϊόντων. Η ενέργεια αυτή δημιουργεί τεράστιες ποσότητες υπολειμμάτων, συμπεριλαμβανομένων των φλουδών, τους σπόρους και τις μεμβράνες. Η λανθασμένη διαχείριση και διάθεση τους αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για το περιβάλλον. Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν φυσικά για την παραγωγή ζωοτροφών και ως οργανικά λιπάσματα. Επίσης μέσω κατάλληλης επεξεργασίας τους με τη χρήση φυσικοχημικών και βιολογικών μεθόδων, μπορούν να παραχθούν χρήσιμα προϊόντα προστιθέμενης αξίας τα οποία έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως πρόδρομες ενώσεις για την παρασκευή χημικών ουσιών και νέων προϊόντων. Ένα σημαντικό προϊόν παραγωγής είναι το ηλεκτρικό οξύ το οποίο σήμερα παράγεται χημικά μέσω υδρογόνωσης του μαλεϊκού οξέος ή μαλεϊκού ανυδρίτη. Το οξύ αυτό μέσω βιοτεχνολογικής του παραγωγής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή βιοδιασπώμενων πολυμερών και ως πρόδρομη ένωση για μια ποικιλία άλλων προϊόντων. Ο πιο γνωστός μικροοργανισμός που μελετάται για την παραγωγή του μέσω ζυμώνσεων είναι το κατά Gram αρνητικό βακτήριο *Actinobacillus succinogenes* το οποίο είναι ένα αποκλειστικά αναερόβιο και αναπτύσσεται σε μεσόφιλες συνθήκες.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη βιοδιεργασίας παραγωγής ηλεκτρικού οξέος μέσω φυσικοχημικών διεργασιών προετοιμασίας των φλουδών από εσπεριδοειδή και ζυμώνσεων με τη χρήση του μικροοργανισμού *Actinobacillus succinogenes* (Rivas, Torrado, Torre, & Converti, 2008; Tan et al., 2014).

1 Εσπεριδοειδή

1.1 Απόβλητα φλούδας εσπεριδοειδών

Τα εσπεριδοειδή αποτελούν μια σημαντική ομάδα καλλιεργήσιμων φρούτων σε παγκόσμια κλίμακα η οποία έχει αυξηθεί σε σύγκριση με παλαιότερα χρόνια. Στην βιομηχανία επεξεργασίας φρούτων το 50-60% καταλήγουν ως απόβλητα τα οποία αποτελούνται από τις φλούδες, τα υπολείμματα μεμβράνης και τους σπόρους. Η ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων αυτών μπορεί να προκαλέσει δυσοσμίες, ρύπανση του εδάφους και των υπόγειων υδροφοριών καθώς και αύξηση των αερίων του θερμοκηπίου κατά την αποσύνθεση τους (Ylivero 2008). Το πρόβλημα διάθεσης που υπάρχει ενισχύει το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη υπεύθυνων τρόπων αντιμετώπισης της διάθεσης των αποβλήτων τους, ιδανικά με το πλεονέκτημα που αποδίδεται στα προϊόντα υψηλής αξίας που λαμβάνονται κατά την ορθή επεξεργασία τους και τη θέσπιση περιβαλλοντικά ορθής προσέγγισης (Angel Siles López et al. 2010). Η σύνθεση της φλούδας των εσπεριδοειδών τις καθιστά ως ελκυστική πρώτη ύλη με δυνατότητα παραγωγής προϊόντων προστιθέμενης αξίας μέσω χημικών, ενζυμικών υδρολύσεως καθώς και βιολογικών μετατροπών (Rivas, Torrado, Torre, & Converti, 2008).

1.2 Σύνθεση φλούδας εσπεριδοειδών

Για την εκμετάλλευση της μέγιστης αξίας από τα απόβλητα φλούδας, είναι σημαντικό να λαμβάνονται σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη χημική τους σύνθεση. Η φλούδα πορτοκαλιού περιέχει εν συντομία διαλυτούς και αδιάλυτους υδατάνθρακες, άμυλο, ίνες συμπεριλαμβανομένων της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και μικρές ποσότητες λιγνίνης, πηκτίνη, τέφρα, λίπος και πρωτεΐνες. Τα διαλυτά σάκχαρα που περιέχονται στις φλούδες πορτοκαλιού περιέχουν γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη ενώ οι αδιάλυτοι πολυσακχαρίτες στα κυτταρικά τοιχώματα των φλουδών περιλαμβάνουν κυρίως κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη. Συνολικά η ημικυτταρίνη αποτελείται κυρίως από μόρια ξυλόζης τα οποία ενώνονται μεταξύ τους μέσω 1,4 – β – γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ μπορεί να περιέχουν επίσης εξόζες και οξέα σακχάρων όπως είναι το ουρονικό οξύ. Η πηκτίνη αποτελείται κυρίως από ουρονικό οξύ και άλλα σάκχαρα όπως είναι η γαλακτόζη και η ραμνόζη. Επιπλέον οι φλούδες περιλαμβάνουν μικρές ποσότητες από οξέα όπως είναι το

κιτρικό, μηλικό, μηλονικό οξαλικό και ασκορβικό οξύ. Σύμφωνα με τους Bampidis & Robinson, 2006 οι οποίοι μελέτησαν τη σύνθεση της φλούδας των πορτοκαλιών αναφέρουν ότι η ξηρή μάζα της φλούδας περιέχει πρωτεΐνες και πολλά μικρής αλυσίδας οργανικά οξέα. Παρ' όλα αυτά η ακριβής σύνθεση των πορτοκαλιών ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες και το κλίμα ανάπτυξης τους (Rivas et al. 2008; Angel Siles López et al. 2010).

1.3 Μέθοδοι αξιοποίησης

1.3.1 Ζωοτροφές

Όπως και με τα περισσότερα φυτικά υποστρώματα οι φλούδες πορτοκαλιών είναι μια ελκυστική πηγή θρεπτικών συστατικών στις μικροβιακές κοινότητες και ιδιαίτερα για τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στη μεγάλη κοιλία των βοοειδών οι οποίοι έχουν εξελιχθεί και προσαρμοστεί στο χώρο αυτό ανάπτυξης τους. Λαμβάνοντας υπόψη το παραπάνω, η ικανότητα αυτή αξιοποιείται με την εισαγωγή των αποβλήτων από εσπεριδοειδή μέσω μηχανικής επεξεργασίας τους σε ζωοτροφές λόγω επίσης της πλούσιας περιεκτικότητας τους σε άμυλο. Παρόλα αυτά υπάρχει κάποιο όριο στην ποσότητα που μπορεί να προστεθεί στη τροφή ενός ζώου για το λόγο ότι μπορεί να προκαλέσει παρακεράτωση της μεγάλης κοιλίας και προβλήματα στη ανάπτυξης του. (Angel Siles López et al. 2010).

1.3.2 Οργανικό λίπασμα

Ο ορισμός της κομποστοποίησης εμπεριέχει τη μετατροπή της οργανικής ύλης σε μια σταθερή ουσία η οποία να έχει την δυνατότητα να διαχειριστεί κατάλληλα, αποθηκευτεί και μεταφερθεί για την ενσωμάτωση της σε χωράφια χωρίς να επηρεάζεται δραστικά το περιβάλλον. Μια εναλλακτική χρήση των αποβλήτων από εσπεριδοειδή είναι η σωστή μετατροπή τους σε λίπασμα μέσω κομποστοποίησης τους. Αυτό επιτυγχάνεται με την τροποποίηση των αποβλήτων μέσω της προσαρμογής της αναλογίας άνθρακα – αζώτου, του pH και του περιεχόμενου σε υγρασία και άλλων σημαντικών παραμέτρων (Van Heerden et al. 2002).

1.4 Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας και βιοκαυσίμων

1.4.1 Αιθέρια έλαια και Δ - λιμονένιο

Τα εσπεριδοειδή περιέχουν αιθέρια έλαια τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων κυρίως ως γευστικοί και αρωματικοί παράγοντες. Βρίσκονται σε θύλακες ή αδένες ελαίων που έχουν διάμετρο η οποία κυμαίνεται από 0,4 έως 0,6 mm και βρίσκονται σε ακανόνιστα σημεία στον εξωτερικό πορτοκαλί φλοιό του φρούτου. Οι φλούδες πορτοκαλιού περιέχουν συνήθως περισσότερα από 5 κιλά έλαια ανά 1000 κιλά πορτοκαλιού από τα οποία το 90 % είναι Δ-λιμονένιο. Το Δ-λιμονένιο είναι ένας κυκλικός υδρογονάνθρακας στην κατηγορία των τερπενίων. Είναι άχρωμο σε θερμοκρασία δωματίου και έχει ισχυρό άρωμα πορτοκαλιού. Ως το κύριο συστατικό της έντονης οσμής των εσπεριδοειδών το Δ-λιμονένιο χρησιμοποιείται στην παρασκευή τροφίμων και φαρμάκων καθώς και ως αρωματική ουσία. Επίσης έχει πολλές εφαρμογές στην χημική βιομηχανία, στα καλλυντικά και σε εγχώρια προϊόντα οικιακής χρήσης. Η διαδικασία εκχύλισης του Δ-λιμονένιου είναι καθιερωμένη και απλή. Μπορεί να απομακρυνθεί από τις φλούδες είτε με ψυχρή συμπίεση, είτε με απόσταξη υδρατμών είτε με εκχύλιση χρησιμοποιώντας κάποιο διαλύτη ο οποίος συνήθως είναι το εξάνιο ή το διοξείδιο του άνθρακα. Το κύριο εμπόδιο για την χρήση των φλουδών από εσπεριδοειδή ως υπόστρωμα κατά την βιοδιεργασία τους είναι η παρουσία του Δ-λιμονένιου. Το συστατικό αυτό είναι πολύ τοξικό για την αφομοίωση των μικροοργανισμών και μειώνει την απόδοση παραγωγής των προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Επίσης το Δ-λιμονένιο είναι ένας ισχυρός αναστολέας των μικροοργανισμών για παραγωγή βιοαιθανόλης. Ως εκ τούτου πρέπει να διαχωρίζεται από τις φλούδες των εσπεριδοειδών πριν από τις ζυμώσεις με τους μικροοργανισμούς (Das et al., 2007; Pourbafrani, Forgacs, Horvath, Niklasson, & Taherzadeh, 2010)

1.4.2 Πηκτίνη

Η πηκτίνη είναι ένας δομικός ετεροπολυσακχαρίτης ο οποίος αξιοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως παράγοντας πηκτοματοποίησης. Χρησιμοποιείται για γεμίσεις, σε γλυκά, ως σταθεροποιητής σε χυμούς φρούτων και σε ροφήματα γάλακτος. Οι φλούδες πορτοκαλιού περιέχουν σημαντικές ποσότητες πηκτίνης. Το κύριο συστατικό των πηκτινών είναι το Δ-γαλακτουρονικό οξύ το οποίο βρίσκεται σε μορφή μακρομορίων τα οποία συνδέονται μέσω 1,4- γλυκοσιδικών δεσμών. Υπάρχουν καθιερωμένες διαδικασίες ανάκτησης της πηκτίνης

από φλούδες πορτοκαλιών οι οποίες περιλαμβάνουν ξήρανση και ακολούθως όξινη υδρόλυση. Το υδρόλυμα διαχωρίζεται και συμπυκνώνεται με απόσταξη υπό κενό ενώ στη συνέχεια διαχωρίζεται από την αιθανόλη. Έπειτα ξηραίνεται στους 70° C. Υπό ιδανικές συνθήκες η απόδοση ανάκτησης της πηκτίνης μπορεί να φτάσει μέχρι και το 13,24 % σύμφωνα με τους Lopez et al. Επιπλέον η στερεά ύλη μετά από την όξινη υδρόλυση μπορεί να αξιοποιηθεί στη παρασκευή ενεργού άνθρακα γεγονός που αυξάνει την αξία της φλούδας. Η πηκτίνη επίσης μπορεί να εξαχθεί από τη φλούδα εσπεριδοειδών μέσω εκχύλισης σε οξύ με τη χρήση πολυγαλακτουρονάσης που παράγεται μέσω εμβολιασμού ορού γάλακτος χρησιμοποιώντας τη ζύμη *Fragilis kluveromyces* (Ylittervo 2008; Angel Siles López et al. 2010).

1.4.3 Βιοαιθανόλη

Η αιθανόλη έχει ένα ευρύ φάσμα από εφαρμογές αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης, ως προσθετικό σε αρώματα, ποτά και στην ιατρική ενώ ταυτόχρονα έχει εφαρμογή ως βιοκαύσιμο για ενέργεια και θέρμανση. Η ζήτηση για καύσιμα που παράγονται από ανανεώσιμες πηγές έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια τόσο λόγω των διακυμάνσεων στην τιμή του πετρελαίου όσο και των ανησυχιών για παραγωγή αερίων του θερμοκηπίου και μόλυνσης του περιβάλλοντος. Η δεύτερη γενιά παραγωγής αιθανόλης εστιάζεται στη μετατροπή κυτταρινούχων πρώτων υλών σε αιθανόλη το οποίο ενισχύει το ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης διαθεσιμότητας τους, το χαμηλό τους κόστος και τη φιλική προς το περιβάλλον παραγωγή της. Οι φλούδες εσπεριδοειδών έχουν αποδειχθεί ως μια αξιόπιστη πρώτη ύλη για παραγωγή αιθανόλης μέσω σταδίων τα οποία περιλαμβάνουν υδρολύσεις με τη χρήση ενζύμων και ζυμώσεις με μικροοργανισμούς όπως είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Παρόλα αυτά λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε αιθέρια έλαια και συγκεκριμένα σε Δ-λιμονένιο πρέπει να προηγούνται διεργασίες απομάκρυνσης του. (Angel Siles López et al.,2010; Wilkins et al.,2007).

1.4.4 Μεθάνιο

Το μεθάνιο αποτελεί το κύριο συστατικό του φυσικού αερίου και μπορεί να παραχθεί βιολογικά με τη χρήση μεθανογενετικών βακτηρίων μέσω αναερόβιων διαδικασιών όπως είναι η αναερόβια χώνευση. Σε αναερόβιες καλλιέργειες η παραγωγή μεθανίου μπορεί να

φτάσει τα 0,49 m³/kg στερεών. Επιπλέον μπορεί να βελτιστοποιηθεί μέσω προεπεξεργασίας των φλούδων πορτοκαλιού χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα στελέχη μικροοργανισμών όπως είναι τα *Sporotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium*. Η προεπεξεργασία με τη χρήση των μυκήτων αυτών ενισχύει τη διαθεσιμότητα στα θρεπτικά συστατικά του μέσου και μειώνει τη συγκέντρωση των αντιμικροβιακών συστατικών. (Angel Siles López et al. 2010)

1.4.5 Βιομηχανικά ένζυμα

Αξιοσημείωτο το γεγονός ότι φλούδες εσπεριδοειδών περιέχουν αξιόλογες ποσότητες πηκτινών οι οποίες μπορούν να επάγουν την σύνθεση πηκτικών ενζύμων από τις μικροβιακές κοινότητες που αναπτύσσονται σε αυτά. Τα ένζυμα πηκτικής έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη βιομηχανία παραγωγής χυμών φρούτων για την διευκόλυνση εκχύλισης των χυμών και την κατηγοριοποίηση τους. Μπορούν να παραχθούν με τη χρήση του μικροοργανισμού *Aspergillus foetidus* σε στερεές καλλιέργειες οι οποίες μελετήθηκαν από τους Garzon and Hours (1992) (Angel Siles López et al. 2010; Garzon & Hours 1992).

1.4.6 Μικροβιακή πρωτεΐνη και κιτρικό οξύ

Η μικροβιακή πρωτεΐνη εξάγεται από καλλιεργήσιμες άλγεις, ζύμες ή βακτήρια. Χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο σε τροφές πλούσιες σε πρωτεΐνες και συγκεκριμένα στις ζωοτροφές. Οι φλούδες εσπεριδοειδών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα παραγωγής μικροβιακής πρωτεΐνης με τη χρήση του μικροοργανισμού *Geotrichum candidum* (Angel Siles López et al. 2010). Το κιτρικό οξύ είναι ένα φυσικό συντηρητικό το οποίο χρησιμοποιείται σε αναλώσιμα κυρίως για να προσθέσει μια όξινη γεύση. Σύμφωνα με Rivas et al (2008) οι φλούδες πορτοκαλιού επίσης μπορεί να αποτελέσουν πρώτη ύλη για παραγωγή κιτρικού οξέος μέσω ζυμώσεων (Rivas et al. 2008).

1.5 Βιοδυσλίστηριο

Για την παραγωγή και ανάκτηση χρήσιμων προϊόντων απαιτείται η δημιουργία ενός βιοδυσλίστηριου. Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Περιβάλλοντος των ΗΠΑ ο ορισμός ενός βιοδυσλίστηριου αναφέρεται ως η βιώσιμη επεξεργασία της βιομάζας για την παρασκευή

ενός φάσματος εμπορεύσιμων προϊόντων. Περιλαμβάνει επεξεργασία της βιομάζας με σκοπό της παραγωγή χρήσιμων προϊόντων μέσω διαδικασιών όπως είναι οι θερμοχημικές και χημικές μετατροπές, οι μετατροπές με τη χρήση ενζύμων και οι μικροβιακές μετατροπές (αναερόβια και αερόβια ζύμωση). Ένα βιοδιυλιστήριο μπορεί να χρησιμοποιήσει ένα ευρύ φάσμα βιομάζας από τη δασοκομία τη γεωργία, υδατοκαλλιέργειες ακόμα και υπολείμματα βιομηχανιών και νοικοκυριών συμπεριλαμβανομένων τα ξύλα, γεωργικές καλλιέργειες, οργανικά υπολείμματα (φυτικά και ζωικά), δασικά υπολείμματα και υδρόβια βιομάζα (φύκια και άλγη) (Jong & Jungmeier 2015).

1.6 Ηλεκτρικό οξύ

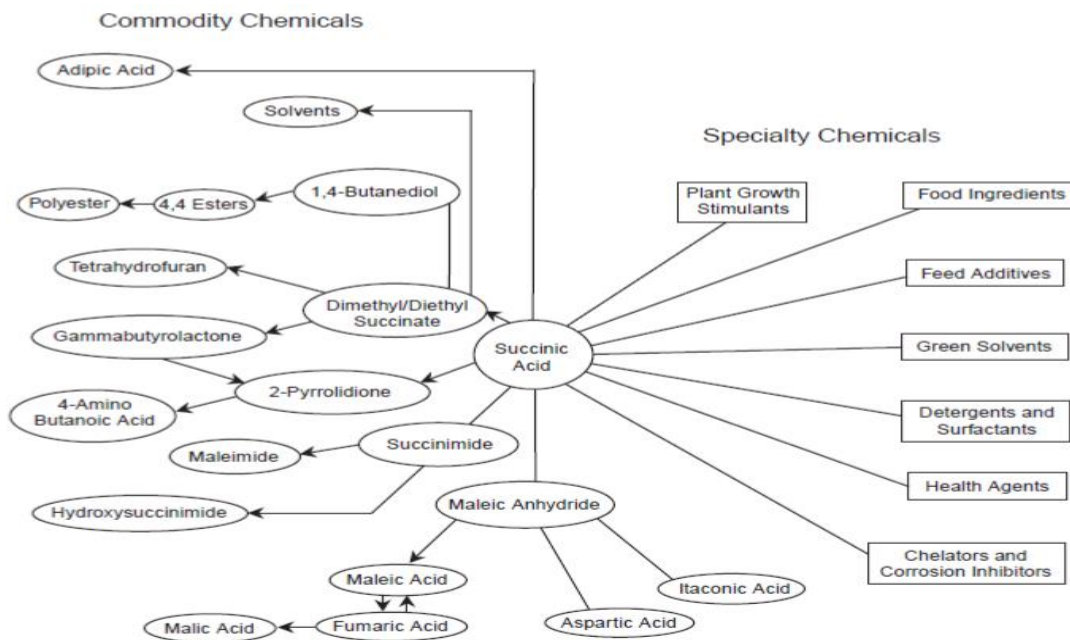
1.6.1 Πληροφορίες

Το ηλεκτρικό οξύ αλλιώς γνωστό ως βουτανοδιϊκό οξύ (IUPAC ονομασία) έχει μοριακό τύπο $C_4H_6O_4$ είναι ένα άχρωμο υπό μορφή κρυστάλλων οξύ το οποίο είναι διαλυτό στο νερό, την αιθανόλη και την ακετόνη. Αρχικά παρασκευάστηκε μέσω απόσταξης του κεχριμπαριού, λατινική ονομασία ήλεκτρο, το 1950 ως εκ τούτου και η ονομασία του. Σύμφωνα με το Υπουργείο Ενέργειας των ΗΠΑ (2004) θεωρείται ως μία από τις 12 βασικές δομικές χημικές ουσίες υψηλής προστιθέμενης αξίας με δυνατότητα παραγωγής του μέσω βιολογικών μετατροπών (Cheng K., Zhao X.B., Zeng J. 2012).

1.6.2 Εφαρμογές και χρήσεις

Το ηλεκτρικό οξύ εντοπίζεται στα ζώα, στα φυτά και σε τρόφιμα. Έχει ευρεία εφαρμογή και χρησιμοποιείται ως προσθετικό στην παραγωγή βερνικιών και αρωματικών εστέρων, ως γευστικός παράγοντας και ως ρυθμιστής οξύτητας, στη βιομηχανία τροφίμων, ως αντιμικροβιακό καθώς και στη βιομηχανία παραγωγής φαρμάκων. Επίσης χρησιμοποιείται στην παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών, βαφών, απορρυπαντικών και για την παρασκευή πράσινων διαλυτών. Λόγω της γραμμικής του δομής και μέσω της βιοπαραγωγής του με τη χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόδρομη ένωση (βλ. Εικόνα 1) για την παραγωγή χημικών ουσιών όπως είναι η 1,4 – βουτανδιόλη, το τετραϋδροφουράνιο, η γ – βουτυρολακτόνη, η N-μεθυλπυρρολιδινόνη και το αδιπικό οξύ. Επίσης χρησιμοποιείται για τη σύνθεση βιοδιασπώμενων πλαστικών όπως είναι τα

πολυαμίδια και οι πολυβουτυλεστέρες (PBS). (Zeikus, Jain, & Elankovan; 1999 Jansen & van Gulik, 2014; Cheng K., Zhao X.B., Zeng J., 2012; Li et al., 2010)



Εικόνα 1: Προϊόντα προστιθέμενης αξίας τα οποία προέρχονται από το ηλεκτρικό οξύ (Zeikus et al., 1999)

1.6.3 Παραδοσιακές και βιοτεχνολογικές μέθοδοι παραγωγής

Σήμερα παράγεται συμβατικά σε βιομηχανική κλίμακα με χημικές διεργασίες παραγωγής μέσω οξείδωσης της παραφίνης και μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης του μαλεϊκού οξέος ή μαλεϊκού ανυδρίτη (Tan et al. 2014). Το ηλεκτρικό οξύ λαμβάνεται μέσω σειράς διαδικασιών όπως είναι η απόσταξη, η κρυστάλλωση και η ξήρανση. Η απόδοση παραγωγής του είναι υψηλή, το ίδιο και η καθαρότητα και επιλεκτικότητα της διαδικασίας χημικής παραγωγής του, παρόλα αυτά είναι περίπλοκη με αρκετές περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Cheng K., Zhao X.B., Zeng J. 2012).

Οι ανάγκες του πλανήτη για εναλλακτικές πηγές ενέργεια εκτός των πετροχημικών έχει οδηγήσει στη συνεχή αναπτυσσόμενη τεχνολογία φυσικής βιοπαραγωγής του από βακτήρια που έχουν απομονωθεί κυρίως από μηρυκαστικά ζώα, μια εναλλακτική μορφή παραγωγής υποσχόμενη να κερδίσει το ενδιαφέρον ανά το παγκόσμιο. Η ανάπτυξη διεργασιών παραγωγής μέσω ζυμώσεων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον τόσο σε βιομηχανική κλίμακα

όσο και στην ακαδημαϊκή έρευνα αφού θεωρείται ως μια πράσινη τεχνολογία σε σύγκριση με την χημική παραγωγή. Αυτό οφείλεται στις μείωση που παρατηρείται στη ρύπανση του περιβάλλοντος με τη χρήση και κατανάλωση ανανεώσιμων πόρων ως υπόστρωμα (Zeikus et al. 1999).

Οι κύριοι παράγοντες και πλεονεκτήματα από τα οποία εξαρτάται η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος είναι το είδος της πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται, το κόστος αγοράς και χρήσης των πρώτων υλών, η εύκολη πρόσβαση, η υψηλή απόδοση μετατροπής τους, η υψηλή συγκέντρωση και πρόσβαση σε ζυμώσιμα σάκχαρα και τέλος η χαμηλή εξάρτηση σε εξωτερικά θρεπτικά συστατικά (Tan et al. 2014).

Περαιτέρω το ηλεκτρικό οξύ είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν το οποίο παράγεται κατά τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος, κύκλος του Krebs, και ένα από τα τελικά προϊόντα μεταβολισμού αναερόβιας ζύμωσης. Κατά την παραγωγή του οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν διοξείδιο του άνθρακα, ενδιαφέρον χαρακτηριστικό το οποίο οδηγεί στη μείωση των αερίων του θερμοκηπίου. (Bechthold et al. 2008).

Αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί ότι στις διεργασίες ζύμωσης η γλυκόζη που βρίσκεται στα υποστρώματα κατανάλωσης μετατρέπεται σε ηλεκτρικό οξύ κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Κατά τις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται ανάλογα με την στοιχειομετρική αφομοίωση σε διοξειδίου του άνθρακα και υδρογόνο οδηγούν στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος, ενδιάμεσες ενώσεις που παράγονται κατά τον κύκλο του Krebs. (Cheng K., Zhao X.B., Zeng J. 2012).

1.6.4 Παραγωγοί ηλεκτρικού οξέος

Η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος μπορεί να επιτευχθεί με διάφορα αυστηρώς ή μερικώς αναερόβια στελέχη όπως είναι τα *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Basfia succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Succinimonas amylolytica*, *Succinivibrio dextrinosolvans*, *Prevotella ruminocola* και *Bacteroides fragilis*.(Cheng K., Zhao X.B., Zeng J. 2012).

Τα πιο σημαντικά και μελετημένα στελέχη είναι ο *Actinobacillus succinogenes*, το *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, το *Mannheimia succiniciproducens* και το *Escherichia coli* λόγω των πολλών ειδών πηγών άνθρακα που καταναλώνουν και της υψηλής

τους απόδοσης. Εκτός από τα θρεπτικά συστατικά που είναι αναγκαία για την διατήρηση της βακτηριακής κυτταρική ανάπτυξης και της φυσιολογικής συντήρησης των κυττάρων, άλλα υποστρώματα συμπεριλαμβανομένου των πρώτων υλών με περιεκτικότητα σε άνθρακα, το διοξείδιο του άνθρακα, το υδρογόνο, όπως επίσης και το pH της καλλιέργειας είναι σημαντικά για την αποδοτική παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος με το χαμηλότερο οικονομικό κόστος. Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα είναι ο πιο άφθονος ανανεώσιμος πόρος στη γη. Η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα είναι υποσχόμενη χρησιμοποιώντας συστήματα βιοδιαδικασιών κατά τα οποία η παραγωγή κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, η υδρόλυση του υποστρώματος και η ζύμωση για παραγωγή ηλεκτρικού συνδυάζονται ή μερικώς συνδυάζονται με ταυτόχρονη χρήση ενός μικροοργανισμού ο οποίος παράγει ηλεκτρικό οξύ. Μερικές διαθέσιμες πηγές άνθρακα είναι το άχυρο, το καλαμπόκι, το τυρόγαλα, το σιτάρι, η μελάσα από ζαχαροκάλαμο, πριονίδια, γλυκερόλη, καρποί σόγιας κ.α. (Tan et al. 2014).

Πίνακας 1: Αποδόσεις και συγκεντρώσεις παραγωγής ανάλογα με το υπόστρωμα και χρήση διαφορετικών στελεχών .

Μικροοργανισμός	Πρώτη Ύλη	Αντιδραστήρας	Παραγωγή H.O (g/L)	Απόδοση παραγωγής H.O (ηλεκτρικού οξέος/ξυνολικών σακχάρων)	Πηγή
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Υδρολυμένο ψωμί	Αναερόβιος SFF	47.3	1,16	(Leung et al. 2012)
<i>Escherichia coli</i>	Φρουκτόζη	Διπλής φάσης, αεριζόμενος αντιδραστήρας	30	0.7	(Vemuri et al. 2002)
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	Τυρόγαλο	Αναερόβιος αντιδραστήρας	34.7	0.91	(Samuelov et al. 1999)
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Υπολείμματα ζαχαροκάλαμου	Αντιδραστήρας με CO ₂ παροχή	23,7	0.79	(Xi et al. 2013)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Φλούδες πορτοκαλιού	Αναερόβιος αντιδραστήρας	1,76	0,044	(Q. Li et al. 2010)

1.7 Μικροοργανισμοί

1.7.1 *Actinobacillus succinogenes*

Ο *Actinobacillus succinogenes* είναι ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο, το οποίο θεωρείται ως ο κυριότερος παραγωγός ηλεκτρικού οξέος. Είναι προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο το οποίο απομονώνεται από τη μεγάλη κοιλία των βοοειδών και ανήκει στην οικογένεια *Pasteurellaceae*, η οποία περιέχει δεκατρία ονομαζόμενα γένη (McKinlay et al. 2010). Είναι ένα πολυμορφικό, καπνόφιλο βακτήριο με μη κινητικά ραβδία. Ο *Actinobacillus succinogenes* ανήκει στην κατηγορία μεσόφιλων βακτηρίων και αναπτύσσεται κυρίως σε θερμοκρασίες 37 – 39° C σε χημικά καθορισμένο περιβάλλον κάτω από αναερόβιες συνθήκες οι οποίες ενισχύονται με παρουσία CO₂. Επιπλέον το CO₂ ενεργοποιεί το μεταβολικό μονοπάτι του μικροοργανισμού για παραγωγή χρήσιμων οξέων και συγκεκριμένα το ηλεκτρικό οξύ. Σύμφωνα με μελέτη που έγινε από τους Zeikus et al., 1999 ο μικροοργανισμός είναι ικανός να καταναλώσει ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, σακχάρων με πέντε ή έξι άνθρακες καθώς και ποικιλία δισακχαριτών και άλλων πηγών άνθρακα όπως είναι η αραβινόζη, η κελλοβιόζη, η φρουκτόζη, η γαλακτόζη, η γλυκόζη, η γλυκερόλη κ.α. (Guettler et al., 1999; Li et al., 2010; Pateraki et al. 2016)

Αν και ο μικροοργανισμός αυτό είναι από τους κυριότερους παραγωγούς ηλεκτρικού οξέος ταυτόχρονα παράγει και άλλα οξέα όπως είναι το φορμικό και το οξικό οξύ, σε υψηλές συγκεντρώσεις κατά τον μεταβολισμό του μέσω του μεταβολικού μονοπατιού του φωσφοενολπυροσταφυλικού οξέος κατά την αναερόβια χώνευση (Vellend, Hughes, Grosberg, & Holt, 2002; McKinlay et al., 2010). Τα μειονεκτήματα στην παραγωγή του μικροοργανισμού εντοπίζονται στην απαίτηση αμινοξέων και βιταμινών, στο ουδέτερο περιβάλλον ανάπτυξης και στην απουσία γενετικών εργαλείων για την γενετική τροποποίηση του. Παρόλα αυτά πλεονεκτήματα εντοπίζονται στη χρήση πολλών πηγών άνθρακα ως υπόστρωμα, στην επαρκή αντοχή του σε αναστολείς και στην επαρκή του απόδοσης ζύμωσης με τη χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας.

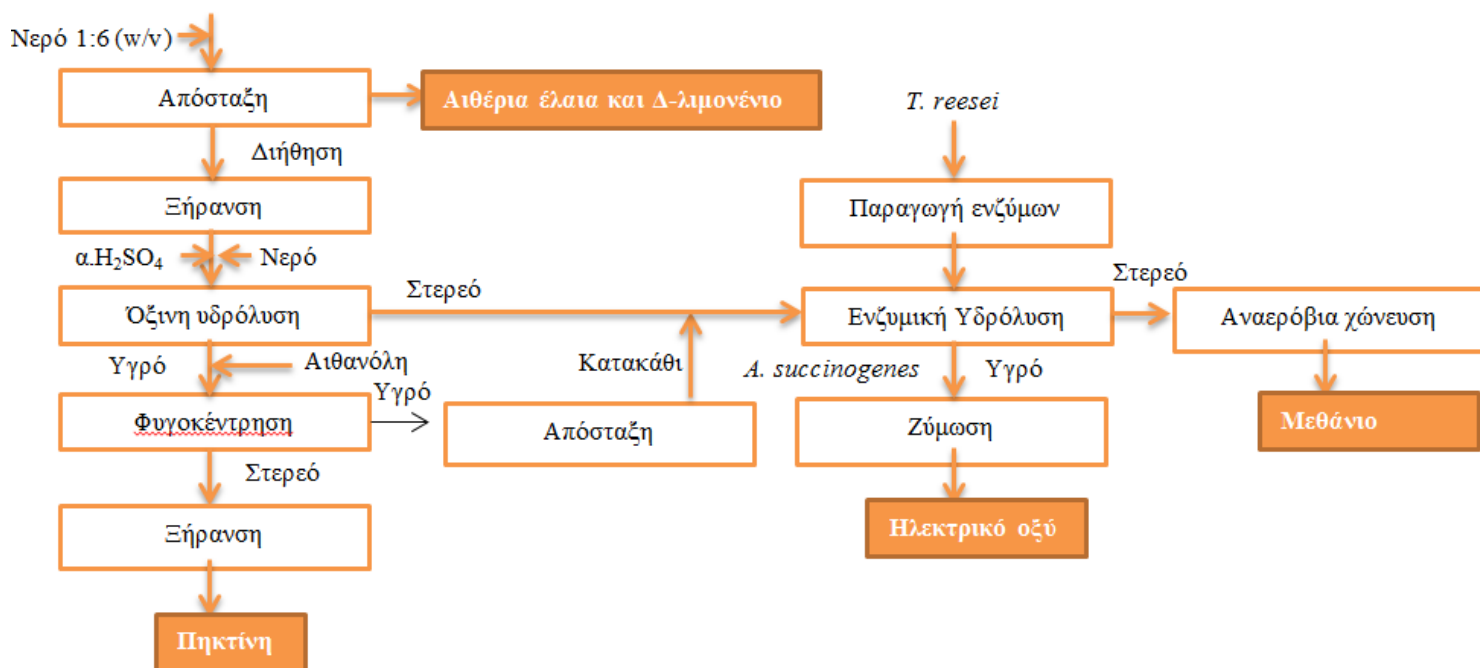
1.7.2 *Trichoderma reesei*

Ο μικροοργανισμός *Trichoderma reesei* είναι ένας μεσοφιλικός νηματοειδής μύκητας ο οποίος χρησιμοποιείται στη βιομηχανία για παραγωγή των ενζύμων κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες για την υδρόλυση φυτικών κυτταρικών πολυσακχαριτών. Έχει σημαντικό ρόλο στον τομέα της ακαδημαϊκής έρευνας ως προς την παραγωγή κυτταρολυτικών ενζύμων τα οποία υδρολύουν πολυσακχαρίτες και τους γλυκοζιτικούς δεσμούς στη βιομάζα για παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως είναι η βιοαιθανόλη, ηλεκτρικό, μηλικό και φουμαρικό οξύ, το ασπαρτικό οξύ και άλλα οξέα. (Martinez et al., 2008; Peciulyte, Anasontzis, Karlstrom, Larsson, & Olsson, 2014)

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Φυτικοχημική επεξεργασία φλουδών εσπεριδοειδών και μικροβιακή ζύμωση για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και άλλων οργανικών

Για την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος και των άλλων οργανικών μέσω μικροβιακών ζυμώσεων ακολουθείται προεπεξεργασία των φλουδών από τα εσπεριδοειδή για προετοιμασία τους. Η φυτικοχημική αυτή προεπεξεργασία περιλαμβάνει τεμαχισμό των φλουδών, εξαγωγή αιθέριων ελαίων και Δ-λιμονένιου, ξήρανση των φλουδών, όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης που βρίσκονται σε αυτές σε ζυμώσιμα σάκχαρα καθώς και ανάκτηση πηκτίνης από το υδρόλυμα τους. Ακολούθως πραγματοποιείται η διαδικασία της μικροβιακής ζύμωσης των υδρολυμάτων για την παραγωγή του προϊόντος. Το σχεδιάγραμμα της εικόνας 1 παρουσιάζει την ροή της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθείται για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος καθώς και επιπρόσθετες επεξεργασίες για περαιτέρω χρήσης της πρώτης ύλης για παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων ηλεκτρικού οξέος.



Εικόνα 1: Σχεδιάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος

2.2 Πρώτη ύλη

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φλούδες από απόβλητα εσπεριδοειδών του είδους «μάντορα» οι οποίες προμηθεύτηκαν από τη βιομηχανία παραγωγής χυμών, αναψυκτικών και αιθέριων ελαίων «KEAN» στην Κύπρο. Οι φλούδες αποθηκεύτηκαν στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθούν. Ακολουθούν διαφορετικές διεργασίες προεπεξεργασίας με σκοπό την προετοιμασία για τη διεργασία της ζύμωσης.

2.3 Προεπεξεργασία

2.3.1 Προετοιμασία φλουδών – Τεμαχισμός

Οι φλούδες προεπεξεργάζονται αρχικά μέσω τεμαχισμού και άλεσης τους, με τη χρήση μίξερ σε υπολείμματα διαμέτρου μικρότερης από 2 mm και ακολούθως αποθηκεύονται στους -20°C .

2.3.2 Εξαγωγή και συλλογή αιθέριων ελαίων και Δ-λιμονένιου

Η εξαγωγή των αιθέριων ελαίων και του Δ-λιμονένιου πραγματοποιείται με απόσταξη των φλουδών για 1 ώρα στους 100°C . Η αναλογία μίγματος απιονισμένου νερού και φλούδας που χρησιμοποιείται είναι 6:1 w/w. Με το τέλος της απόσταξης το στερεό υπόλειμμα φιλτράρετε σε φίλτρο διαμέτρου 0,4 μm μέσω διήθησης για την απομάκρυνση της ποσότητας νερού που περιέχεται. Ακολουθείται ξήρανση στους 70°C για 24 ώρες ή έως πλήρους απομάκρυνσης της υγρασίας. (Wilkins, Widmer, Grohmann, et al. 2007)

2.3.3 Όξινη υδρόλυση ημικυτταρίνης και κυτταρίνης

Η όξινη υδρόλυση ακολουθεί την ξήρανση. Ξηρό υπόλειμμα των φλουδών απαλλαγμένο από αιθέρια έλαια και Δ-λιμονένιο αναμειγνύεται με απιονισμένο νερό σε αναλογία στερεού: υγρού 1:10 ή 1:20 (w/v). Στο μίγμα προστίθεται ποσότητα πυκνού θεικού οξέος καθαρότητας 96% με τελική συγκέντρωση 0,5 % v/v H_2SO_4 . Το μίγμα τοποθετείται σε αυτόκαυστο σε συνθήκες θερμοκρασίας 109°C ή 116°C και χρόνο παραμονής 10 ή 20 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε αποστειρωμένο περιβάλλον για 10 λεπτά στις 3000

στροφές. Επιπλέον αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία χαμηλότερη από 64° C. Έπειτα πραγματοποιείται διήθηση με τη χρήση φίλτρου 0,4 μm σε αποστειρωμένες συνθήκες. Το υδρόλυμα συλλέγεται ξεχωριστά από το στερεό υπόλειμμα σε φιάλες για μετέπειτα επεξεργασία ενώ το στερεό υπόλειμμα συλλέγεται σε αποστειρωμένες φιάλες και φυλάγεται στους -4° C μέχρι επιπλέον επεξεργασίας του. Η όξινη υδρόλυση γίνεται με σκοπό τη διάσπαση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης σε απλούστερα σάκχαρα για ευκολία της διεργασίας της ζύμωσης και παραγωγής του επιθυμητού προϊόντος. Πραγματοποιούνται όξινες υδρολύσεις όπως φαίνονται στον Πίνακα 2 από τις οποίες τα υδρολύματα μέσω της κατάλληλης επεξεργασίας τους θα χρησιμοποιηθούν για την διεξαγωγή των πειραμάτων ζύμωσης. Η επιλογή των συνθηκών όξινης υδρόλυσης πραγματοποιείται σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα από τους Grohmann *et al* και Talebnia *et al*.

Πίνακας 2: Πίνακας πειραμάτων συνθηκών όξινης υδρόλυση και ζύμωσης

Πείραμα	Όξινη υδρόλυση			Ζύμωση		
	T (° C)	Χρόνος (min)	Ξηρή φλούδα (%)	Όγκος εμβολίου (%)	MgCO ₃ (g/L)	Yeast Extract (g/L)
1	109	10	5	13	30	5
2		20				
3		10	10			
4		20				
5	116	10	5			
6		20				
7		10	10			
8		20				

2.3.4 Συλλογή και ανάκτηση πηκτίνης

Για την ανάκτηση της πηκτίνης στο υδρόλυμα μετά από όξινη υδρόλυση προστίθεται ίση ποσότητα αιθανόλης 96 % καθαρότητας και αφήνεται σε ηρεμία για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (25° C) με σκοπό την ιζηματοποίηση της πηκτίνης που βρίσκεται στο υδρόλυμα. Το ίζημα διαχωρίζεται στη συνέχεια από το υδρόλυμα μέσω φυγοκέντρησης στις 3000 στροφές για 30 λεπτά. Η ανάκτηση της πηκτίνης γίνεται με ξήρανση του ιζήματος στους 50° C (Pourbafrani et al. 2010). Το υδρόλυμα συλλέγεται μετά την φυγοκέντρηση. Ακολουθώς το υδρόλυμα χωρίς πηκτίνη αποστάζεται σε θερμοκρασία 80° C (σ. ζ. αιθανόλης) έτσι ώστε να αφαιρεθεί και να συλλεχθεί η ποσότητα αιθανόλης που περιέχει η οποία περιορίζει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά την ζύμωση (Faravash & Ashtiani 2007) .

Έπειτα αφήνεται έως ότου φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και γίνεται ρύθμιση του pH του υδρολύματος με τη χρήση NaOH και πεχάμετρου σε pH 5.5. Τέλος με φίλτρου διαμέτρου 0,4 μm το υδρόλυμα διηθείται και συλλέγεται σε αποστειρωμένο περιβάλλον.

2.4 Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος

2.4.1 2.4.1 Μικροβιακές ζυμώσεις

Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένων υδρολυμάτων τα οποία προήλθαν από την φυσικοχημική προεπεξεργασία των στερεών ξηρών φλούδων από εσπεριδοειδή κατόπιν διαφορετικών συνθηκών όξινης υδρόλυσης, θερμοκρασίας, χρόνου παραμονής και ποσοστού αναλογίας φλούδας, μαζί με εμβόλιο μικροοργανισμού *Actinobacillus succinogenes*, MgCO₃ και Yeast Extract. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν για τελικό όγκο ζυμώσιμου υλικού και εμβολίου 100 mL, σε pH 5-5,5, θερμοκρασία 37° C, στα 100 στροφές σε υδρόλουτρο για 6 μέρες. Η διαδικασία της ζύμωσης χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα το υδρόλυμα προεπεξεργασίας, ενώ απαιτεί παροχή 0,5 vvm CO₂ για αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης και ενεργοποίηση του μεταβολισμού του, τα οποία ενώνονται μέσω διάταξης σωληνώσεων μαζί με τους βιοαντιδραστήρες ζύμωσης (Pateraki et al. 2016).

2.4.2 Ανάπτυξη μικροοργανισμού *Actinobacillus succinogenes*

Ο μικροοργανισμός *Actinobacillus succinogenes* αναπτύσσεται σε 50 mL αποστειρωμένου βιομέσου Tryptone Soya Broth (TSB) όγκου 50 mL και συγκέντρωσης 30 g/L, σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 37° C και ταχύτητα ανάδευσης 100 στροφές. Ο

μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται βρίσκεται αποθηκευμένος σε κρυογόνα φιαλίδια των 1,5 mL σε 15% γλυκερόλη στους -20°C , ποσότητα του οποίου προστίθεται στο βιομέσο σε αποστειρωμένο περιβάλλον. Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού εντοπίζεται στις 24 h. Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων πριν τον εμβολιασμό πραγματοποιείται έλεγχος της οπτικής πυκνότητας του μικροοργανισμού σε φασματοφωτόμετρο για μήκος κύματος 600 nm.

2.4.3 Προετοιμασία ζύμωσης

Θρεπτικά συστατικά για πηγή άνθρακα και αζώτου όπως είναι το βιομέσο ζύμωσης MgCO_3 και Yeast Extract αντίστοιχα συγκέντρωσης 30 g/L και 5 g/L ζυγίζονται για τελικό όγκο υδρολύματος 100 mL και αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο μέσα σε Duran χωρίς την ποσότητα νερού μαζί με τα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν για την διεκπεραίωση της διεργασίας της ζύμωσης.

Στη συνέχεια 13% εμβόλιο του μικροοργανισμού και 87 % από το φυγοκεντρημένο υδρόλυμα προστίθενται στο MgCO_3 και το Yeast Extract έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100 mL, σε αποστειρωμένο περιβάλλον. Οι σωληνώσεις της διάταξης ενώνονται, η παροχή του διοξειδίου του άνθρακα ανοίγεται και οι καλλιέργειες τοποθετούνται στο υδρόλουτρο.

Δείγματα λαμβάνονται 2 φορές την μέρα για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα αρχίζοντας από τις μηδέν ώρες.

2.5 Ανάπτυξη μικροοργανισμού *Trichoderma reesei*

Ο μικροοργανισμός *Trichoderma reesei* χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενζύμων και συγκεκριμένα κυτταρινασών. Καλλιεργήθηκε σε βιομέσο το οποίο αποτελείται από Wheat Bran 40 g/L, Avicel 10 g/L, Peptone 3 g/L, Yeast Extract 0.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 4 g/L και Tween – 80 0.2 mL/L σε Duran του 1 L με αναλογία υγρού- αέρα 1:5 (. Η καλλιέργεια επωάζεται σε αναδύομενο αντιδραστήρα, σε θερμοκρασία 28°C , για 6 μέρες στις 180 στροφές σε pH 5.5. Κατά την διάρκεια των 6 ημερών γίνεται λήψη ποσότητας δείγματος σε αποστειρωμένο περιβάλλον, η οποία φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 3000 στροφές και το υπερκείμενο φυλάγεται έως ότου χρησιμοποιηθεί στους -4°C . Μετά την επώαση των 6 ημερών και την λήψη των

δειγμάτων γίνεται προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των ενζύμων στα δείγματα τα οποία λήφθηκαν ακολουθώντας την μέθοδο Ghose με σκοπό την κατασκευή πρότυπης καμπύλης ενζυμικής δραστηριότητας σε συνάρτηση με το χρόνο και την εύρεση του μέγιστου χρόνου παραγωγής ενζύμων (Union et al. 1987).

2.6 Μέθοδοι ανάλυσης

2.6.1 Διαδικασία λήψης δείγματος

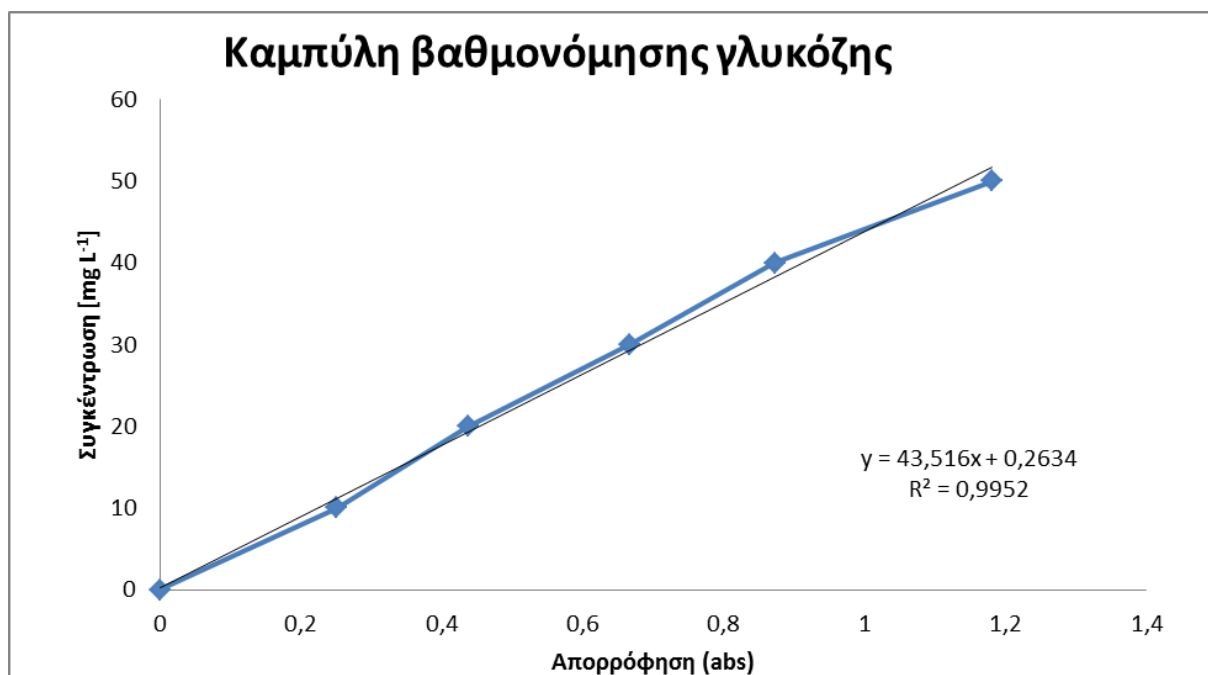
Η διαδικασία λήψης δείγματος επαναλαμβάνεται 2 φορές την ημέρα. Αρχικά 1 mL δείγματος λαμβάνεται και απορρίπτεται με σκοπό τον καθαρισμό της σωλήνωσης από εναπομένων στάσιμο βιομέσο. Στη συνέχεια γίνεται λήψη 3 mL σε ποτήρι ζέσεως των 5 mL. Το δείγμα αναλύεται με μέτρηση του pH. Ακολουθώς σε erpendorf tube των 1.5 mL γίνεται αραίωση δείγματος – υδροχλωρικού οξέος 7 % v/v, σε αναλογία 1:5. Η διαδικασία γίνεται εις διπλούν σε σκοπό τη λήψη πιο ακριβών μετρήσεων. Τα δείγματα αναλύονται στο φασματοφωτόμετρο μετρώντας την οπτική τους πυκνότητα σε μήκος κύματος 600 nm αφού πρώτα έχει μηδενιστεί με απιονισμένο νερό. Σε δύο erpendorf tubes των 1,5 mL προστίθεται 1 mL αντίστοιχα από την εναπομένουσα ποσότητα του δείγματος η ποσότητα φυγοκεντρείται για απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων $MgCO_3$ για 4 λεπτά στα 1330 rpm, το υπερκείμενο συλλέγεται σε 2 νέα erpendorf tubes και φυλάγεται στους $-4^{\circ} C$ μέχρι περαιτέρω ανάλυση.

2.6.2 Χρωματομετρικός Προσδιορισμός Ολικών Σακχάρων – Μέθοδος Dubois

Η αρχή της χρωματομετρικής μεθόδου προσδιορισμού σακχάρων Dubois βασίζεται στην διάσπαση των δι-, όλιγο-, και των πολυσακχαρίτων σε απλά σάκχαρα με την αφυδάτωση τους προς φουρφοουραλικά και υδροξυμεθυλφουρφοουραλικά παράγωγα (πεντόζες και εξόζες αντίστοιχα). Στη συνέχεια τα παράγωγα αυτά σχηματίζουν έγχρωμα σύμπλοκα έτσι ώστε να μπορέσουν να προσδιοριστούν φασματοφωτομετρικά. Ο σχηματισμός των συμπλόκων επιτυγχάνεται με την προσθήκη φαινόλης και η διάσπαση των σακχάρων με την προσθήκη $\pi.H_2SO_4$ 96% v/v. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει αρχικά, την αραίωση του δείγματος σε αναλογία 1:10 με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια σε 1 mL αραίωσης προστίθεται 25 μL φαινόλης 80% w/v και 2,5 mL $\pi.H_2SO_4$ 96 % v/v. Σε κάθε προσθήκη

χημικού γίνεται έντονη ανακίνηση με τη χρήση αναδευτήρα vortex. Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 25 λεπτά λόγω της εξώθερμης αντίδρασης με το π. H_2SO_4 . Στην συνέχεια μετρώνται στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 490 nm όπου απορροφούν οι εξόζες αφού πρώτα μηδενιστεί με το τυφλό δείγμα. Τα δείγματα μετρώνται σε διπλές για πιο ακριβή αποτελέσματα αφού πρώτα το φασματοφωτόμετρο μηδενιστεί με τη χρήση τυφλού δείγματος το οποίο περιέχει 1 mL απιονισμένο νερό, 25 μL φαινόλη και 2,5 mL H_2SO_4 .

Επιπλέον κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης με τη χρήση του υδατάνθρακα γλυκόζη ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) σε μήκος κύματος 490 nm για μετατροπή των απορροφήσεων σε συγκεντρώσεις συνολικών σακχάρων σε γλυκόζη.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης γλυκόζης

2.6.3 Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας- Μέθοδος Ghose

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην μέτρηση της δραστικότητας του ενζύμου κυτταρινάσης μεταφραζόμενη σε μονάδες “filter paper units” FPU. Αρχικά γίνεται φυγοκέντριση για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων και φιλτράρισμα με χρήση φίλτρου 0,4 μm . Για την διαδικασία χρησιμοποιείται citrate buffer και αντιδραστήριο DNS καθώς και χαρτί διήθησης τύπου Whatman διαστάσεων 1×3 cm που αποτελείται από κυτταρίνη. Πραγματοποιούνται 3 αραιώσεις με citrate buffer και τελικού όγκου 750 μL στις οποίες προστίθεται το χαρτί διήθησης και τοποθετούνται για θέρμανση στους 50° C σε υδρόλουτρο

για χρονικό διάστημα 1 ώρα. Επιπλέον πραγματοποιούνται 3 αραιώσεις στις οποίες δεν προστίθεται χαρτί διήθησης και ένα τυφλό δείγμα το οποίο περιέχει μόνο 750 μL citrate buffer . Στα δείγματα προστίθενται 1,5 mL αντιδραστηρίου DNS για τη δημιουργία συμπλόκων σε υδρόλουτρο για χρονικό διάστημα 5 λεπτών σε θερμοκρασία 100° C. Έπειτα μεταφέρονται σε κρύο υδρόλουτρο και προστίθενται 10 mL απιονισμένου νερού. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετράται σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 540 nm. (Union et al. 1987)

2.6.4 Φασματομετρία Μοριακής Απορρόφησης στο Υπεριώδες/ Ορατό (UV/Vis)

Το φασματοφωτόμετρο JENWAY 7015 χρησιμοποιείται για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του μικροοργανισμού *A.succinogenes* κατά την ανάπτυξη του στο εμβόλιο, και στις ζυμώσεις σε μήκος κύματος 600 nm.

Επιπλέον χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της απορρόφησης των συνολικών υδατανθράκων στα δείγματα ανάλυσης με τη μέθοδο Dubois φαινόλης-θεικού οξέος σε μήκος κύματος 490 nm και για την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμηση ολικών υδατανθράκων σε συνάρτηση με την απορρόφηση.

Τέλος το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της απορρόφησης δειγμάτων για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού *T.reesei* σε μήκος κύματος 540 nm χρησιμοποιώντας την μέθοδο Ghose.

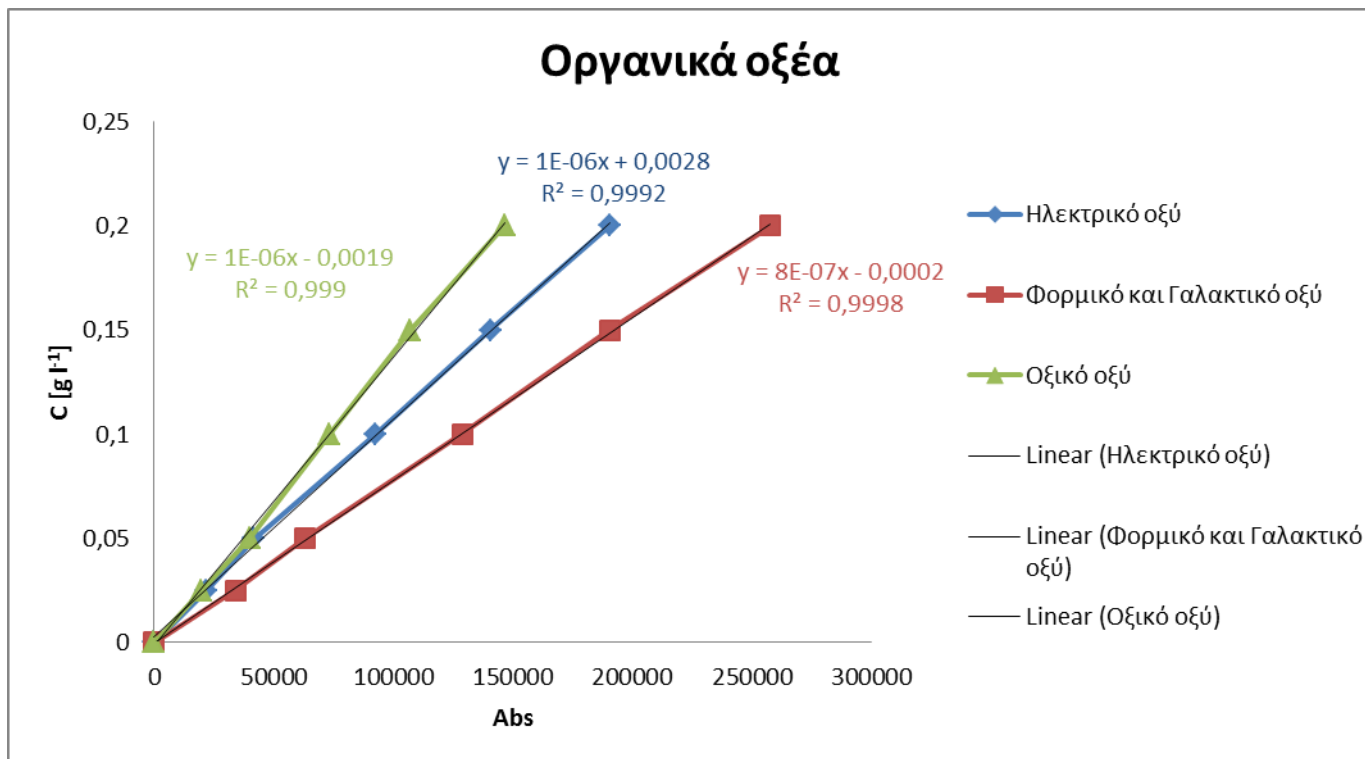
2.6.5 Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των οργανικών οξέων που παράγονται κατά τη ζύμωση με την κατανάλωση των σακχάρων από τον μικροοργανισμό πραγματοποιείται με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Τα υπερκείμενα των δειγμάτων που φυγοκεντρώνται για 4 λεπτά στις 1330 στροφές αραιώνονται με 5 mM H_2SO_4 σε αναλογία 1:18 και φιλτράρονται με τη χρήση φίλτρου πορώδους 0,2 μm .

Οι στήλη η οποία χρησιμοποιείται στην HPLC για την ανάλυση των δειγμάτων είναι οργανικής ανάλυσης στήλης και συγκεκριμένα η Rezex RHM-Monosaccharide H^+ (8 %)

column, Phenomenex, US στη οποία το δείγμα διαπερνά για διαχωρισμό με ροή $0.6 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ στους 50° C . Ο όγκος έκχυσης η οποία γίνεται είναι $20 \text{ }\mu\text{L}$.

Επιπλέον κατασκευάζονται πρότυπες καμπύλες των οργανικών οξέων που παράγονται κατά τις ζυμώσεις, ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος με σκοπό της ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των οξέων που παράγονται.



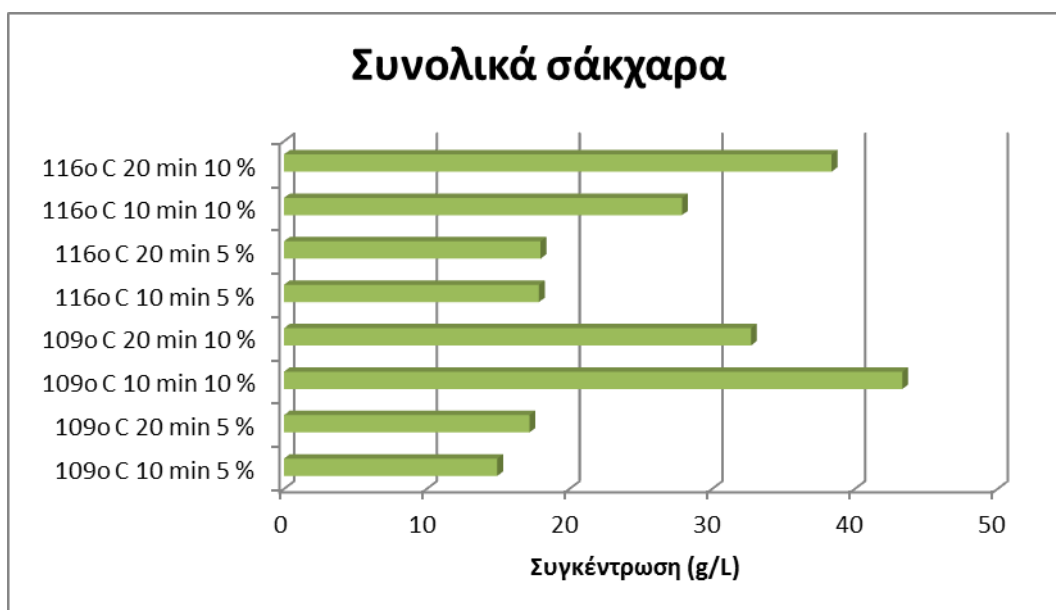
Διάγραμμα 2 :Καμπύλη βαθμονόμησης α) ηλεκτρικού οξέος β) φορμικού και γαλακτικού οξέος γ) οξικού οξέος

3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

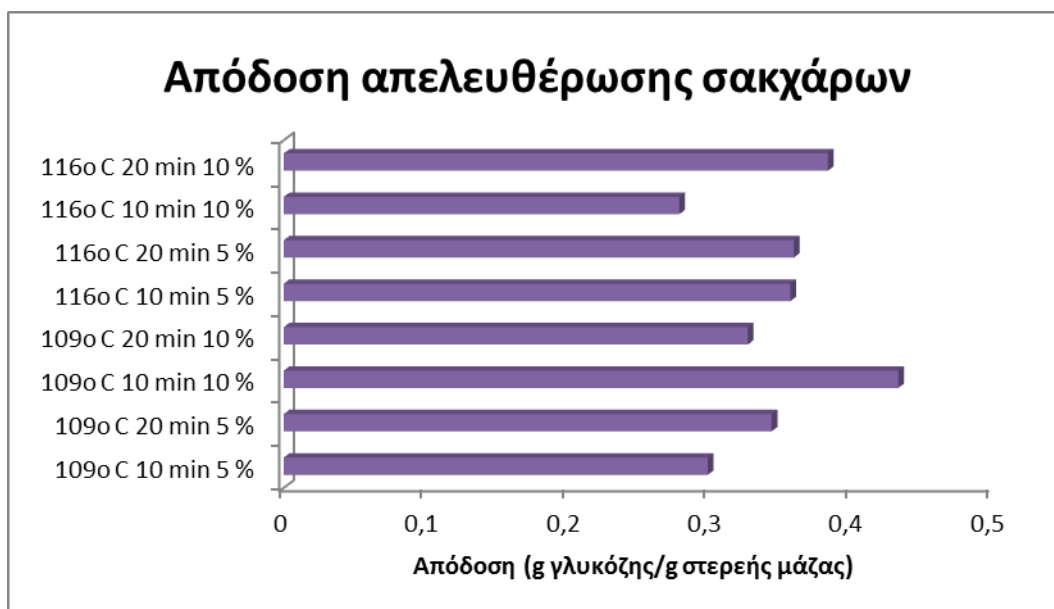
Στην παρούσα μελέτη διεξάχθηκαν πειράματα μικροβιακών ζυμώσεων από υδρολύματα διαφορετικών συνθηκών όξινης υδρόλυσης έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί σύγκριση παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και άλλων οξέων κατά τον μεταβολισμό του εν χρήσει μικροοργανισμού *A.succinogenes* καθώς και της κατανάλωσης σακχάρων κατά την διάρκεια των ζυμώσεων. Τα πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε μορφή διαγραμμάτων και γίνεται συζήτηση γύρω από τα παρατηρούμενα αποτελέσματα ώστε να διεξαχθούν τα απαραίτητα συμπεράσματα.

3.1 Όξινες υδρολύσεις

Αρχικά εξετάστηκαν οι ποσότητες σακχάρων οι οποίες παράγονται με την διάσπαση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης στις φλούδες εσπεριδοειδών οι οποίες είναι απαλλαγμένες από αιθέρια έλαια. Οι συγκεντρώσεις και αποδόσεις των όξινων υδρολύσεων στις διαφορετικές συνθήκες διεξαγωγής παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3 και 4.



Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση συγκέντρωσης σακχάρων σε υδρολύματα διαφορετικών συνθηκών όξινης υδρόλυσης.



Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση απόδοσης συνολικής απελευθέρωσης υδατανθράκων ανά γραμμάριο ξηρής μάζας μετά από όξινες υδρολύσεις διαφορετικών συνθηκών

Οι φλούδες εσπεριδοειδών από την παραγωγή χυμών υδρολύθηκαν με 0,5 % v/v H_2SO_4 για θερμοκρασίες 109 και 116° C, χρονικό διάστημα 10 και 20 λεπτά σε ποσοστό αναλογίας στερεής μάζας 5 και 10 %. Η υψηλότερη συγκέντρωση σακχάρων που απελευθερώθηκαν με τη διάσπαση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης κατά τις υδρολύσεις όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα επιτεύχθηκε σε συνθήκες 109° C για 10 λεπτά με ποσοστό αναλογίας στερεής μάζας 10 % και η δεύτερη υψηλότερη σε συνθήκες 116° C για 20 λεπτά με ποσοστό αναλογίας στερεής μάζας 10 %. Η μέγιστη απόδοση συγκέντρωσης συνολικών σακχάρων που παράγονται κατά τη διάσπαση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης ως προς τη συγκέντρωση των συνολικών στερεών είναι 0,4333 g συνολικών σακχάρων / g πρώτης ύλης. Για συνθήκες όξινης υδρόλυσης 116° C h για 20 λεπτά με ποσοστό αναλογίας μάζας 10% η απόδοση απελευθέρωσης των σακχάρων ως προς τη συγκέντρωση της στερεής μάζας ήταν 0,3837 g γλυκόζης / g πρώτης ύλης.

3.2 Ζυμώσεις

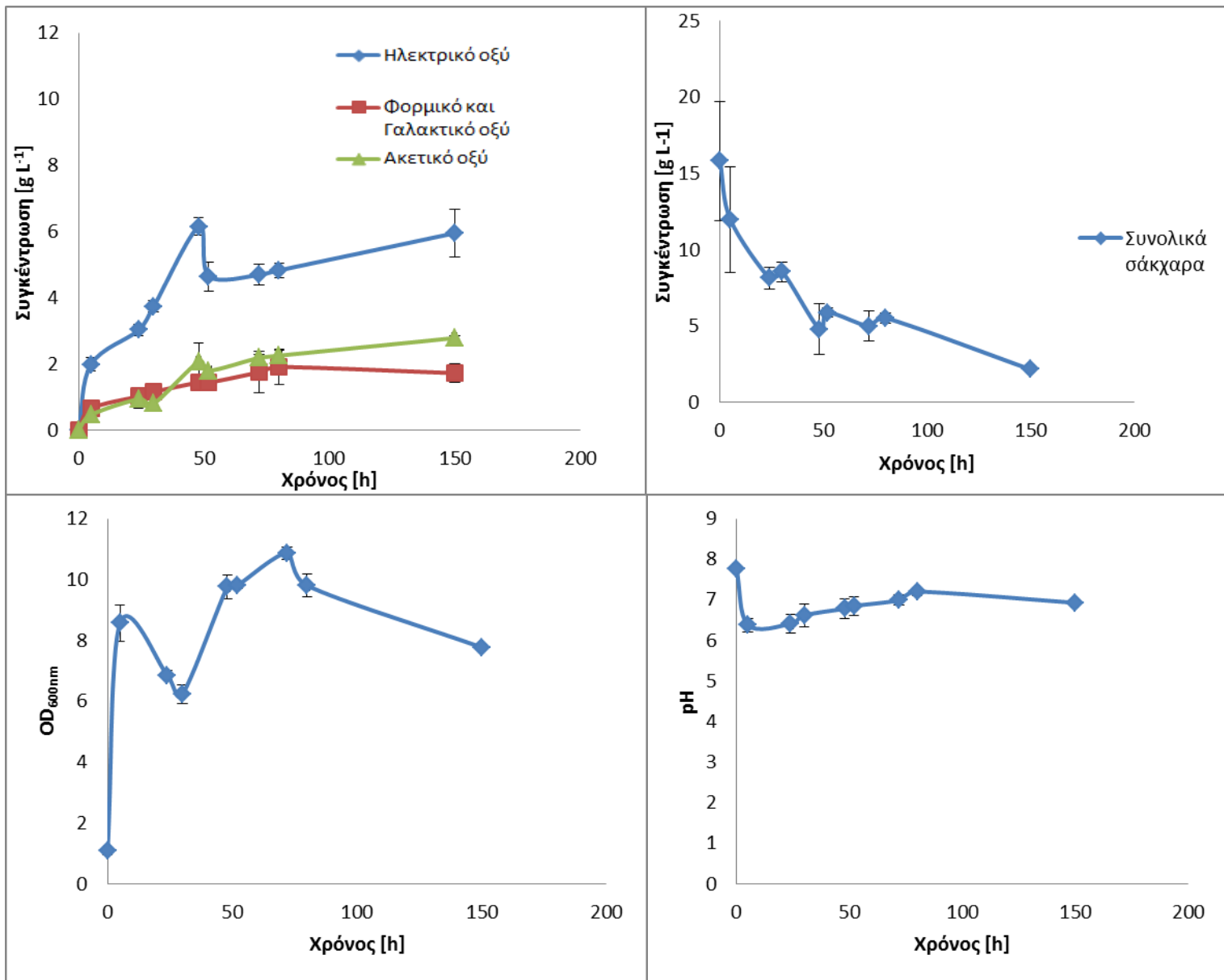
Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιοποίηση των αποβλήτων φλούδας εσπεριδοειδών για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας και συγκεκριμένα ηλεκτρικό οξύ. Φυσικοχημικές μέθοδοι επεξεργασίας έλαβαν χώρα για την προετοιμασία των φλουδών για

τη διεργασία των ζυμώνσεων με τη χρήση του μικροοργανισμού *Actinobacillus succinogenes*. Κατά τη διεξαγωγή των μικροβιακών ζυμώνσεων λαμβάνονταν δείγματα τα οποία αναλύθηκαν στη συνέχεια για εξαγωγή επιθυμητών συμπερασμάτων. Κατά την επεξεργασία έγινε μέτρηση pH, φασματομετρική μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έλεγχος της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, χρωματομετρικός προσδιορισμός των συνολικών υδατανθράκων με τη μέθοδο Debois για εύρεση της κατανάλωσης των σακχάρων κατά την διεργασία και τέλος επεξεργασία με τη χρήση HPLC για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων οξέων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μικροβιακής ζύμωσης για τις διαφορετικές συνθήκες προεπεξεργασίας με όξινη υδρόλυση παρουσιάζονται σε μορφή διαγραμμάτων ανάλογα με τις συνθήκες όξινης υδρόλυσης κατά την φυσικοχημική επεξεργασία.

Μέσω των ζυμώνσεων λαμβάνονται οι κατάλληλες μετρήσεις και δεδομένα έτσι ώστε να γίνει βελτιστοποίηση του σταδίου της όξινης υδρόλυσης η οποία εφαρμόστηκε σε διαφορετικές συνθήκες για την εξαγωγή των βέλτιστων συνθηκών και παραγωγής ηλεκτρικού οξέος.

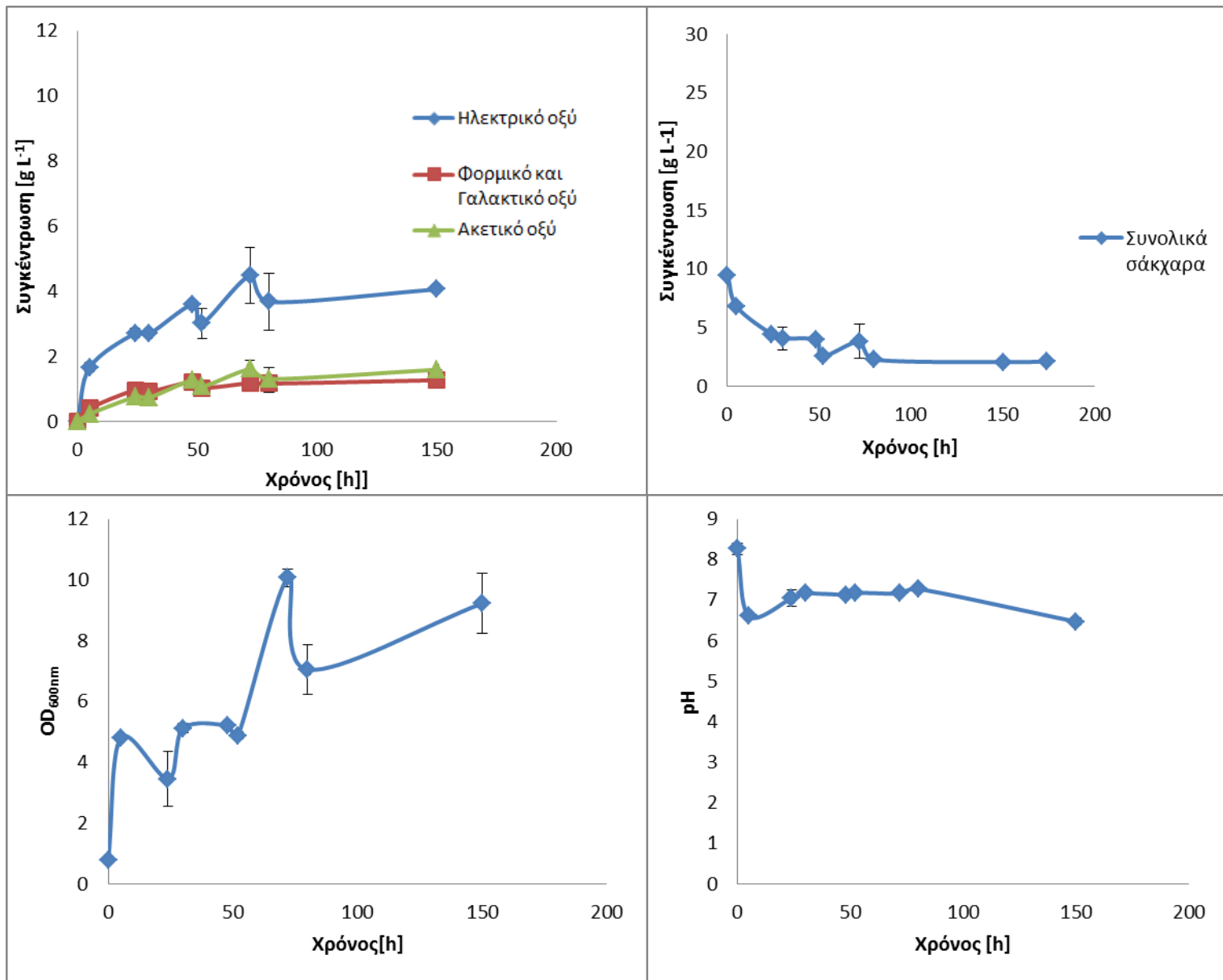
Η επιλογή των συνθηκών προεπεξεργασίας μέσω όξινης υδρόλυσης που πραγματοποιείται επιτυγχάνεται βάση των πειραματικών αποτελεσμάτων σύμφωνα με τους Talebnia et al (2008) για την επιλογή κυρίως των θερμοκρασιών και ποσοστού στερεής μάζας καθώς επίσης και τους Grohmann et al (1995).

Συνθήκες: 109°C 10 λεπτά 5 % φλούδα



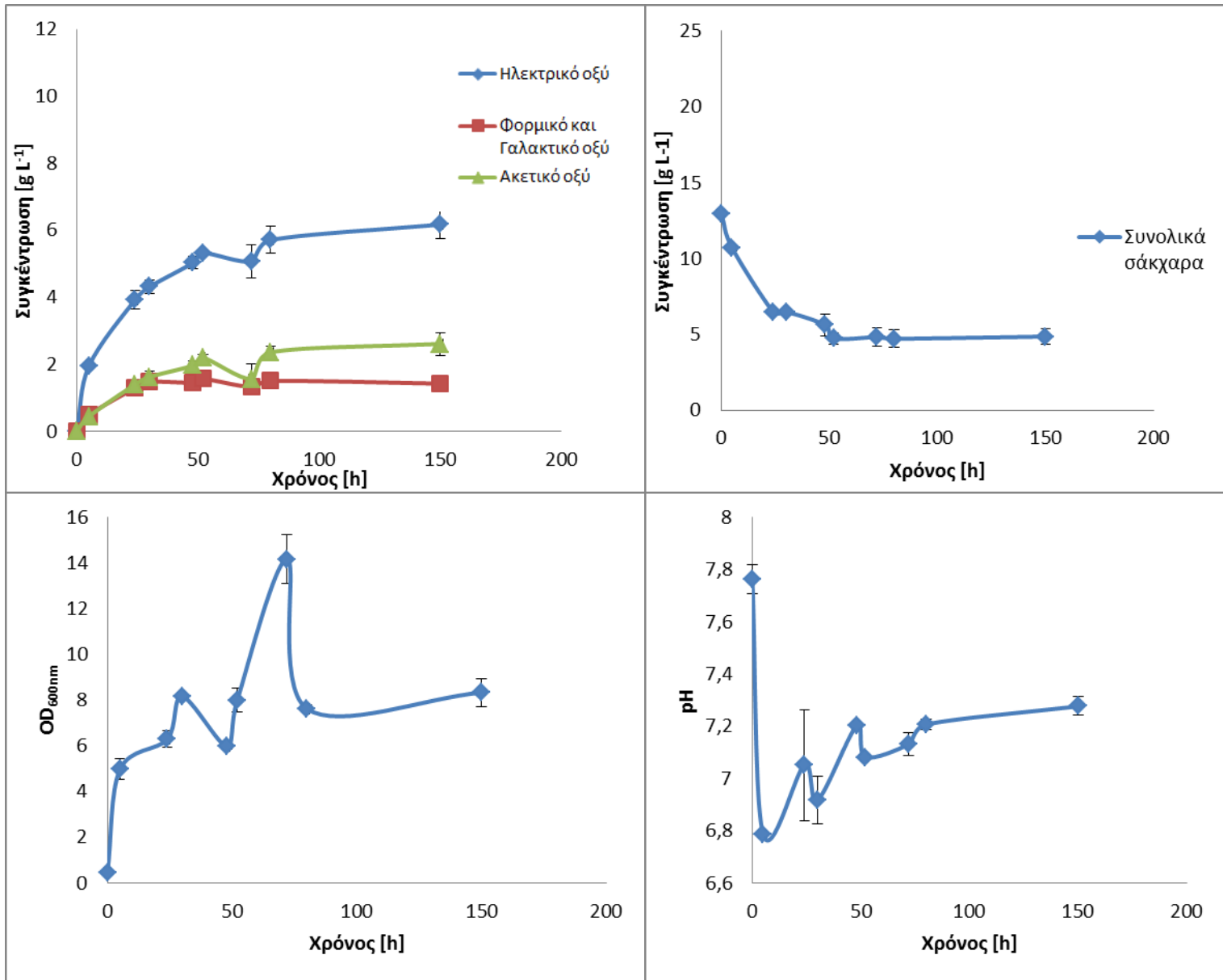
Διάγραμμα 5: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 10 min, 5 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητα μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH

Συνθήκες 109°C 10 λεπτά 10 % φλούδα



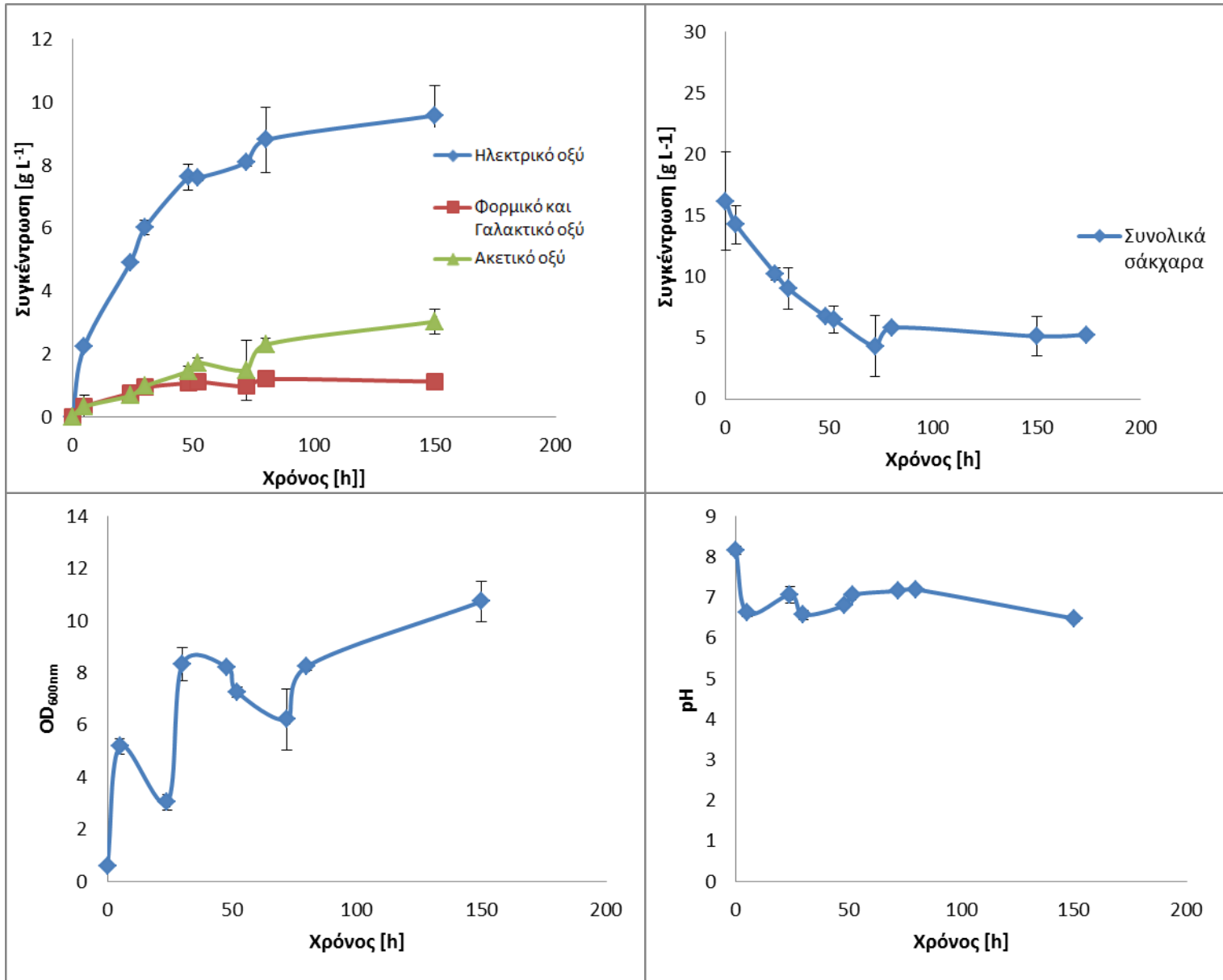
Διάγραμμα 6: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 10 min, 10 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητα μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH

Συνθήκη 109°C 20 λεπτά 5 % φλούδα



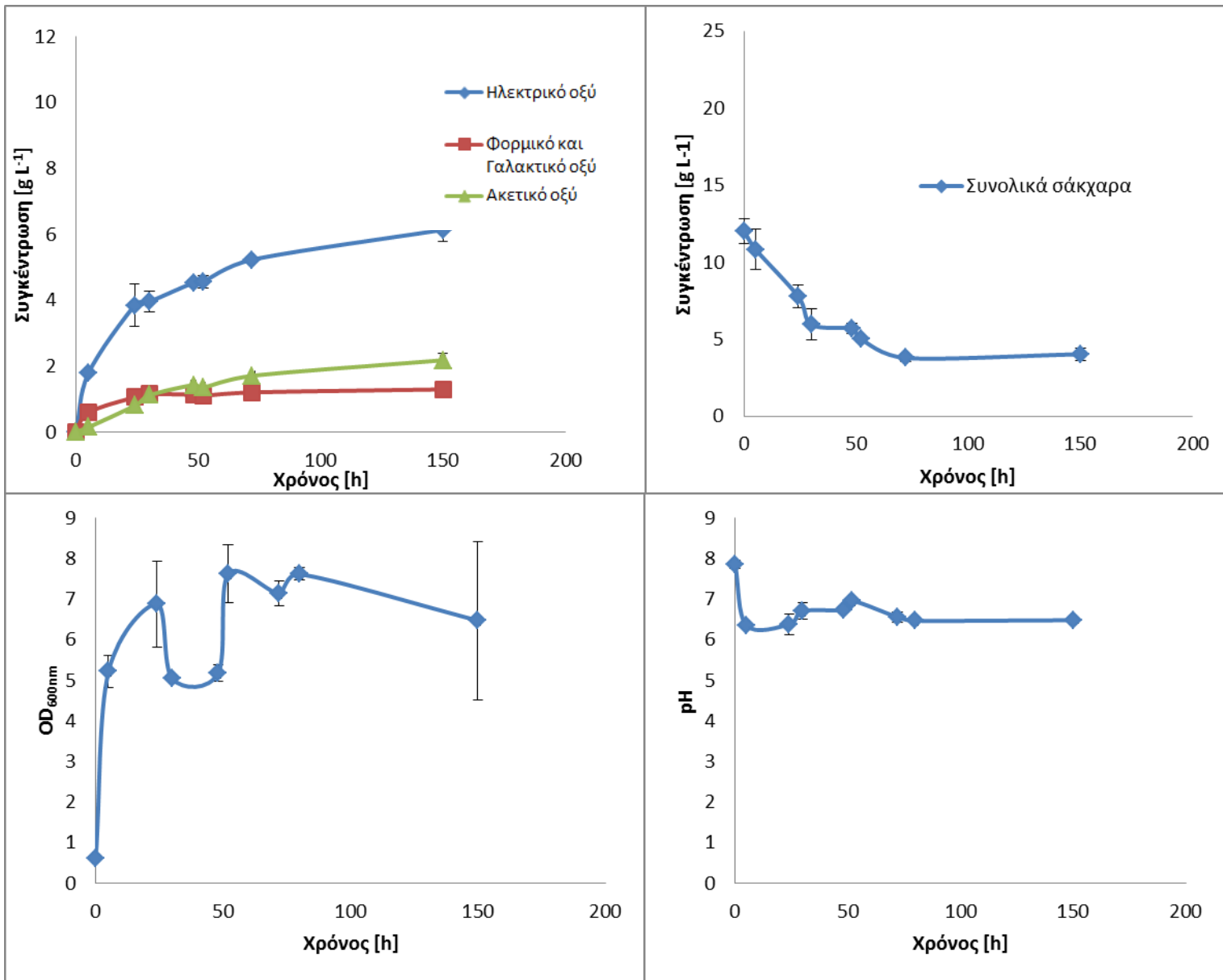
Διάγραμμα 7: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 20 min, 5 % στερεής μάζα α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητα μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH

Συνθήκη 109° C 20 λεπτά 10 % φλούδα



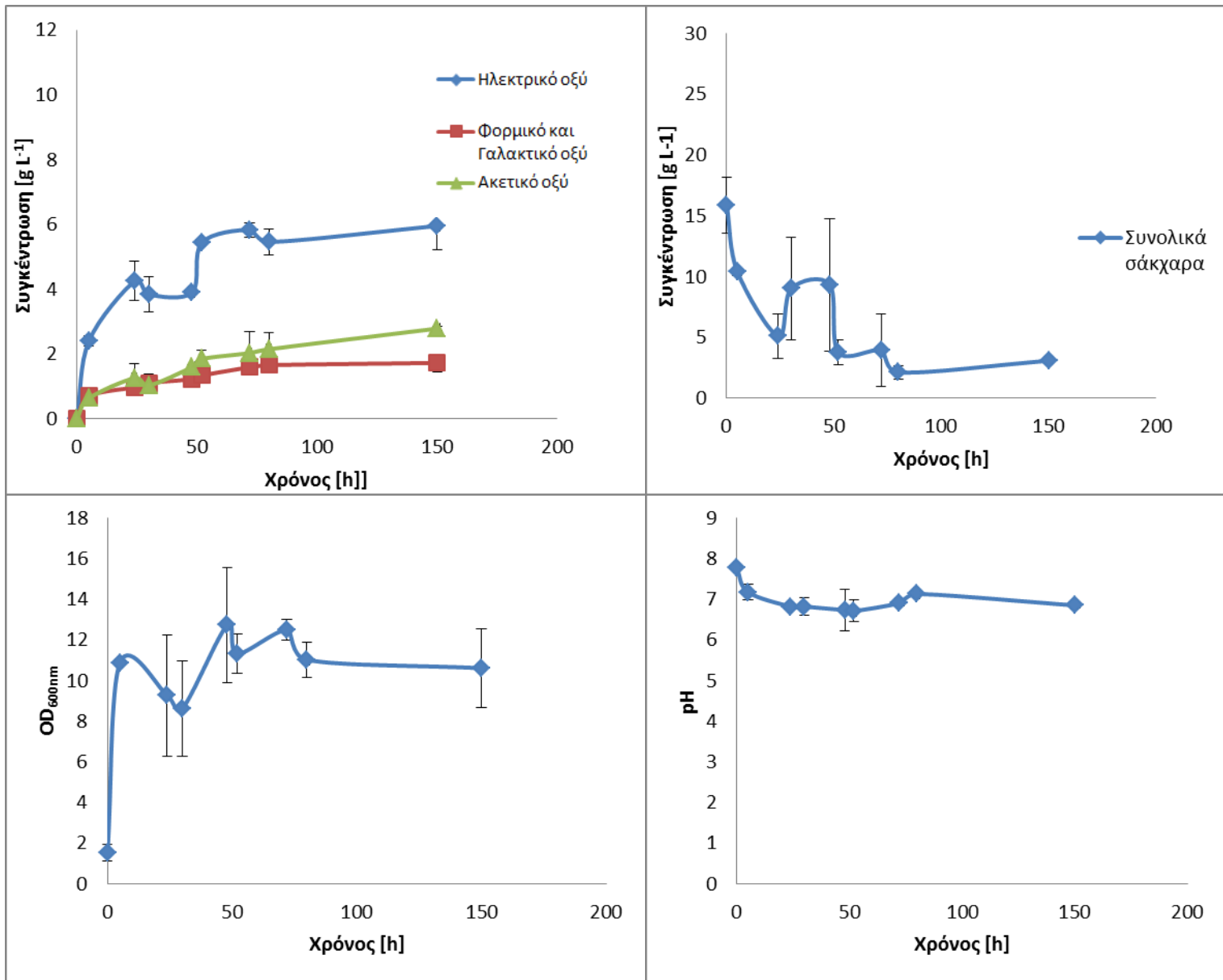
Διάγραμμα 8: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 20 min, 10 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητα μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH

Συνθήκη 116°C 10 min 5 % φλούδα



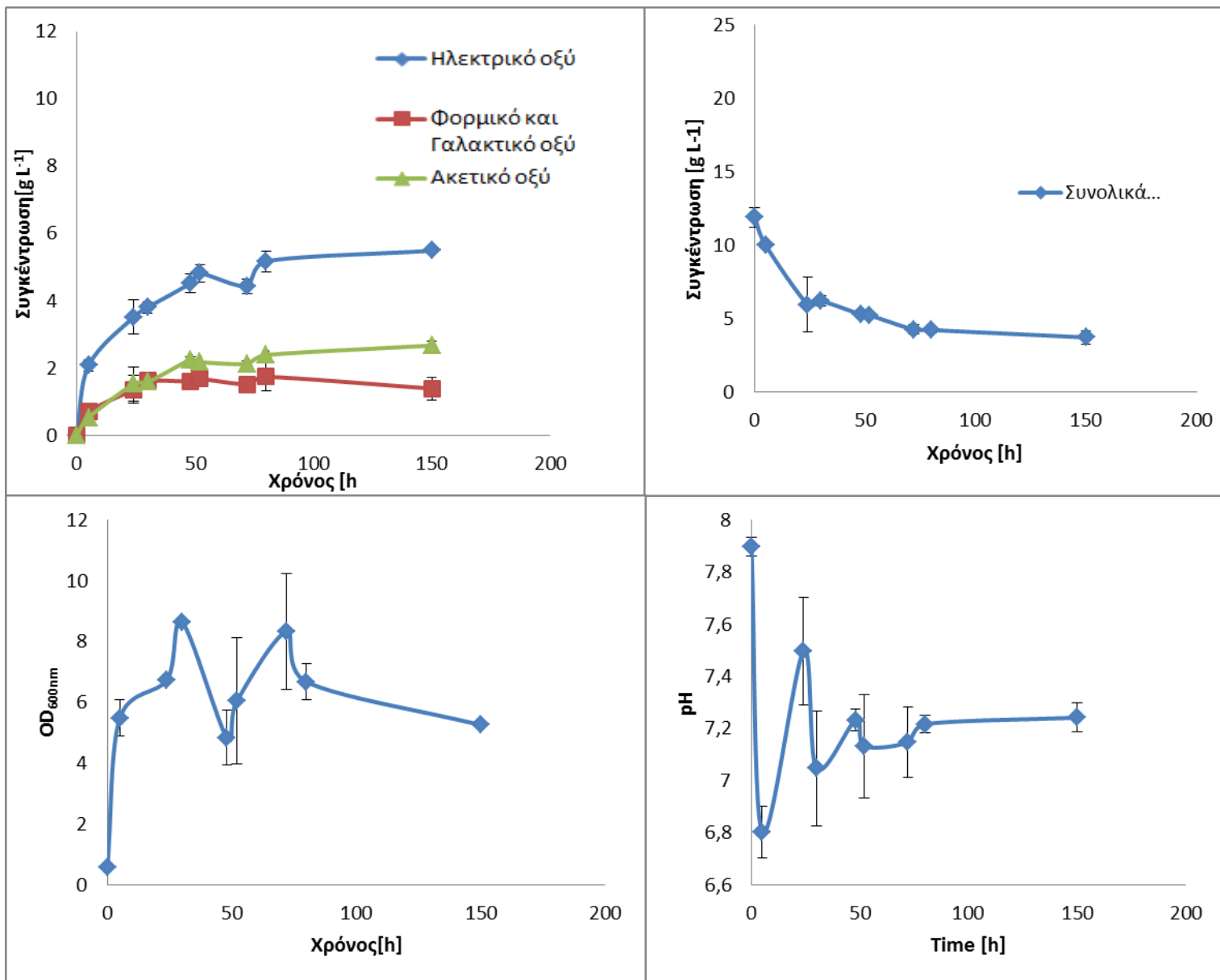
Διάγραμμα 9: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 116°C, 10 min, 5 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητα μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH

Συνθήκη 116°C 10 min 10 % φλούδα



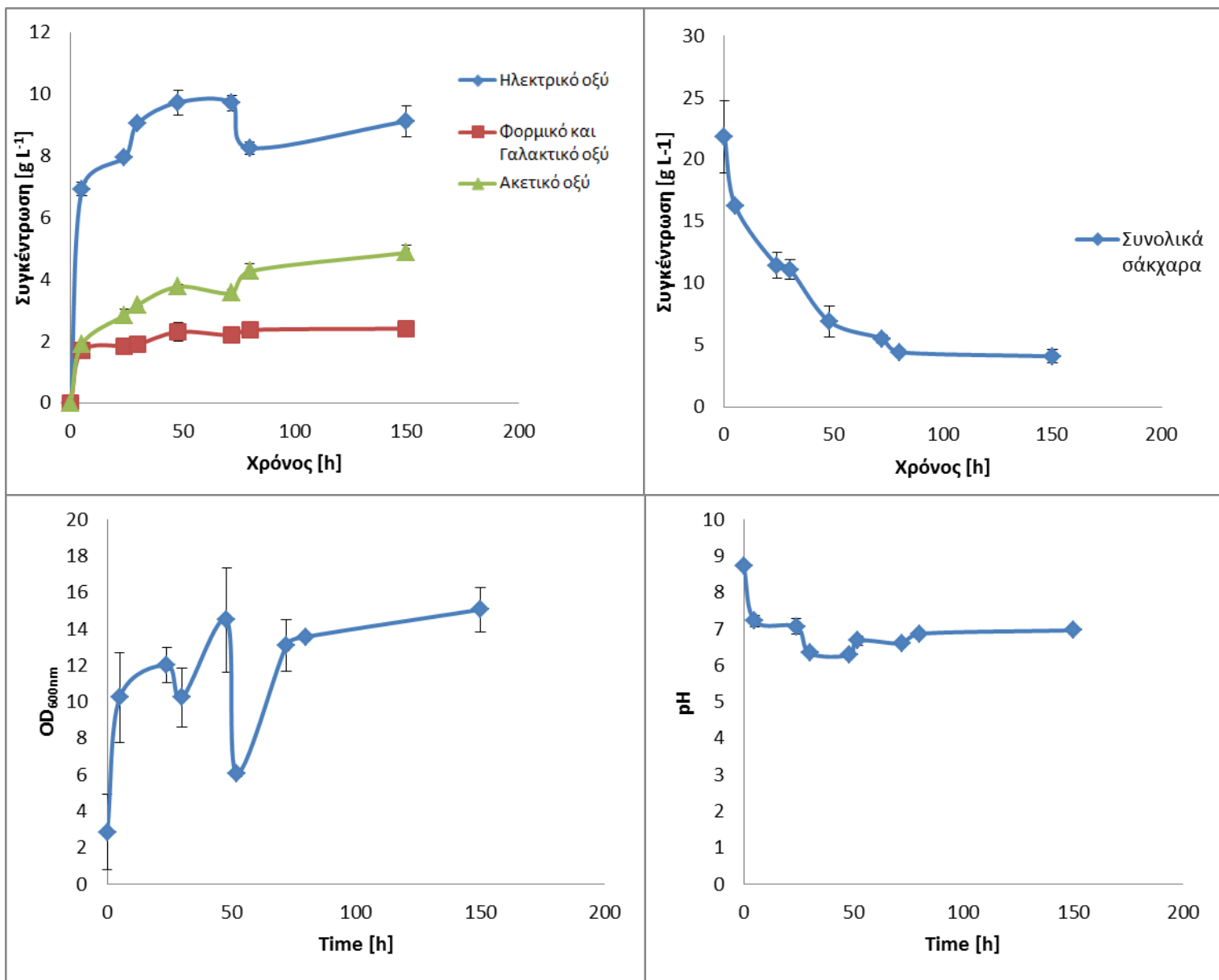
Διάγραμμα 10: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 10 min, 10 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητα μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH

Συνθήκη 116°C 20 min 5 % φλούδα



Διάγραμμα 11: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 20 min, 5 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητα μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH

Συνθήκη 116°C 20 min 10% φλούδα



Διάγραμμα 12: Γραφικές παραστάσεις σε σχέση με το χρόνο συνθηκών όξινης υδρόλυσης 109° C, 20 min, 10 % στερεής μάζας α) συγκέντρωσης ηλεκτρικού, φορμικού, γαλακτικού και οξικού οξέος β) συνολικών σακχάρων που καταναλώνονται γ) οπτική πυκνότητα μικροοργανισμού δ) μεταβολής pH

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ζύμωσης με τη χρήση υδρολυμάτων από διαφορετικές συνθήκες προεπεξεργασίας μέσω όξινης υδρόλυσης παρατηρείται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των σακχάρων, τα οποία είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό του μικροοργανισμού ο οποίος χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα για την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος τα σάκχαρα του ζυμώσιμου υποστρώματος. Η πηγή αυτή άνθρακα ενισχύεται με τη προσθήκη του άλατος $MgCO_3$ ενώ η ποσότητα του Yeast Extract που προστίθεται λειτουργεί ως πηγή αζώτου. Το CO_2 που παρέχεται δημιουργεί τις αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης ενώ επιπλέον ενεργοποιεί το μεταβολικό μονοπάτι του μικροοργανισμού για παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος (Pateraki et al. 2016).

Κατά την προκατεργασία των υδρολυμάτων το pH ρυθμίζεται περίπου 5-5,5. Για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού απαιτείται ουδέτερο σχετικά pH των βιομέσων. Κατά την διάρκεια των ζυμώσεων παρατηρείται το pH σε χρόνο 0 ώρες να έχει τιμή περίπου 8 – 8.5 για όλα τα υδρολύματα. Η τιμή αυτή μειώνεται σε χρονικό διάστημα 24 ωρών όπου και σταθεροποιείται σε ουδέτερο.

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρουσιάζει κινητική μικροβιακής ανάπτυξης με την μέγιστη ανάπτυξη του κατά την εκθετική του φάση περίπου στις 72 ώρες για όλα τα πειράματα ενώ μετά τις 80 -100 ώρες ο πληθυσμός του μικροοργανισμού στο βιομέσο μειώνεται σύμφωνα με τα αποτελέσματα μέτρησης της οπτικής του πυκνότητας.

Επιπλέον η μέγιστη παραγωγή των οργανικών οξέων επιτυγχάνεται κατά μέσο όρο σε χρονικό διάστημα 150 ώρες όπου ακολουθεί σταδιακή μείωση της παραγωγής λόγω θανάτου του μικροοργανισμού το οποίο οφείλεται κυρίως στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών και υποστρώματος ανάπτυξης.

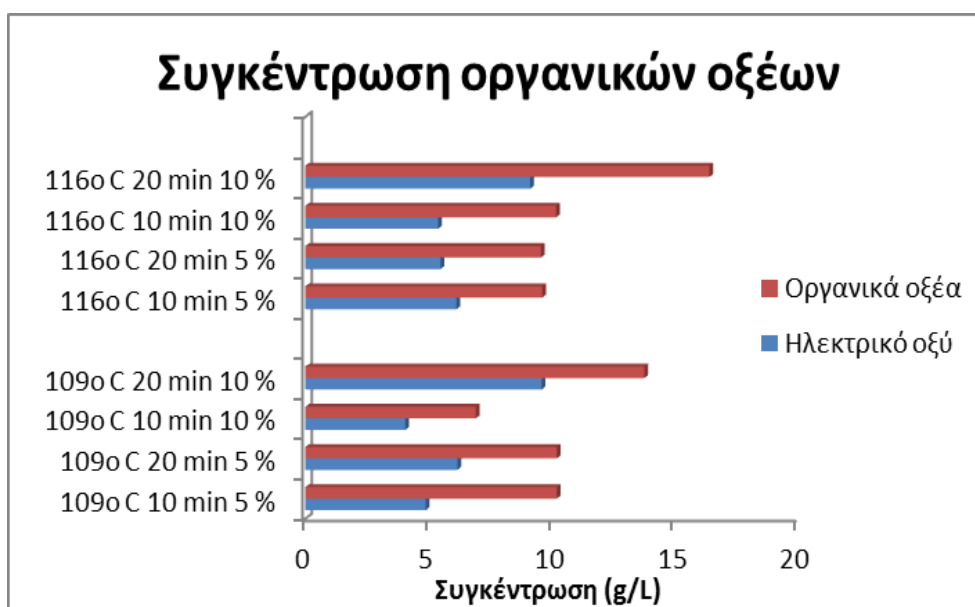
3.3 Παραγωγή οργανικών οξέων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Διαγράμματος 13 η μέγιστη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος επιτυγχάνεται για συνθήκες όξινης υδρόλυσης $109^\circ C$, χρονικού διαστήματος 20 λεπτών και ποσοστού στερεής μάζας 10 % με συγκέντρωση παραγωγής $9,578575 g/L$ ηλεκτρικό οξύ. Σε χρόνο ζύμωσης 150 ώρες παρατηρείται να βρίσκεται σε μέσο όρο η μέγιστη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος όπως και των παραπροϊόντων παραγωγής έτσι τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 13 αναφέρονται στον αντίστοιχο χρόνο ζύμωσης. Παράλληλα η μέγιστη παραγωγή των οργανικών οξέων που παράγονται παρουσιάζεται

σχεδόν αποκλειστικά για χρόνο ζύμωσης 150 ωρών σε όλα τα πειράματα. Στο Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι μέγιστες συγκεντρώσεις παραγωγής των οξέων από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με αναγραφόμενες τις συνθήκες προκατεργασίας των υδρολυμάτων με όξινη υδρόλυση στον αντιπροσωπευτικό χρόνο ζύμωσης 150 ώρες.

Πίνακας 3: Πίνακας συνθηκών και ποσοτήτων μέγιστης παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και συνολικών οργανικών οξέων.

Συνθήκες όξινης υδρόλυσης			Ηλεκτρικό Οξύ (g/L)	Συνολικά Οργανικά Οξέα (g/L)
Θερμοκρασία (° C)	Χρόνος (min)	Ποσοστό ξηρής μάζας (%)		
109	10	5	4.88534	10.19653
109	10	10	4.05881	6.92328
109	20	5	6.17037	10.20046
109	20	10	9.57858	13.75336
116	10	5	6.13565	9.60666
116	10	10	5.38431	10.17546
116	20	5	5.48855	9.55256
116	20	10	9.11860	16.38689

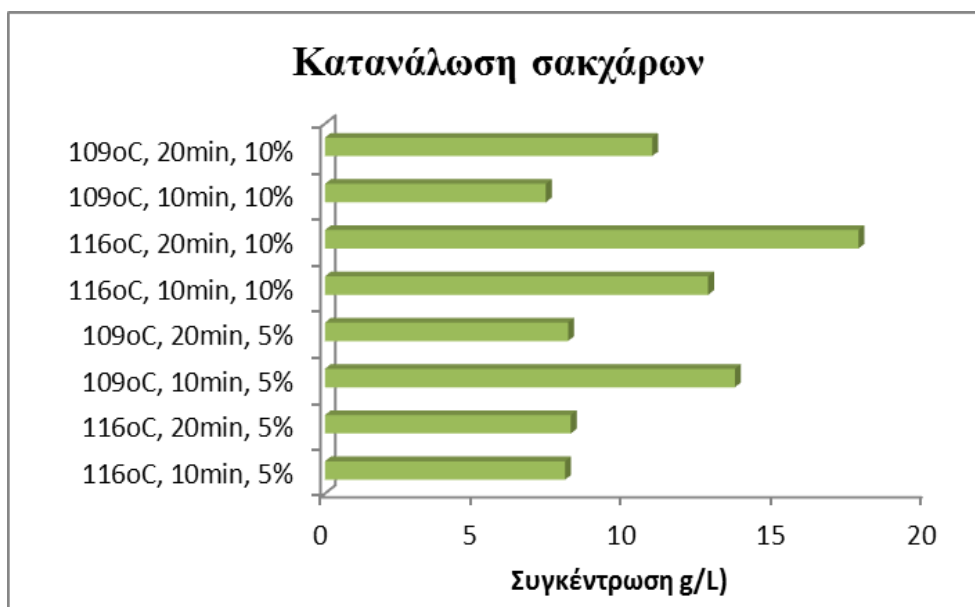


Διάγραμμα 13: Γραφική παράσταση μέγιστων συγκεντρώσεων παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και συνολικών οργανικών οξέων για τις διάφορες συνθήκες όξινης υδρόλυσης κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων των υδρολυμάτων

3.4 Κατανάλωση Σακχάρων

Η μέγιστη κατανάλωση σακχάρων κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων με τη χρήση του μικροοργανισμού *A.succinogenes* παρατηρείται στο πείραμα με υδρόλυμα από συνθήκες προκατεργασίας με όξινη υδρόλυση θερμοκρασίας 116° C, χρόνου 20 λεπτών και ποσοστό στερεής μάζας 10 % όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 14.

Η τιμή μέγιστης κατανάλωσης σακχάρων είναι 17,7546 g/L, η οποία συνάδει με τη τιμή μέγιστης παραγωγής συνολικών οργανικών οξέων.. Η διαφορά των τιμών κατανάλωσης των σακχάρων οφείλεται κυρίως στην αρχική συγκέντρωση των σακχάρων στα ζυμώσιμα υδρολύματα όξινων υδρολύσεων καθώς και στο μεταβολικό μονοπάτι του μικροοργανισμού προς την παραγωγή οργανικών οξέων.



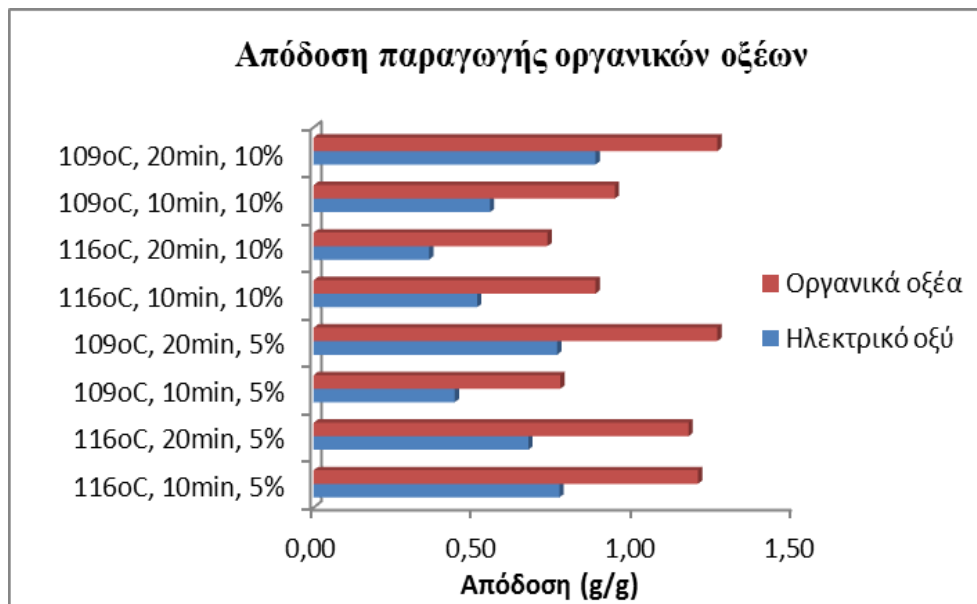
Διάγραμμα 14: Γραφική παράσταση σύγκρισης κατανάλωσης σακχάρων κατά τα πειράματα ζυμώσεων

3.5 Απόδοση παραγωγής οργανικών οξέων

Στο Διάγραμμα 15 παρουσιάζονται οι αποδόσεις παραγωγής ηλεκτρικού οξέων και συνολικών οργανικών οξέων για όλα τα πειράματα ζύμωσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η υψηλότερη απόδοση παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και συνολικών οργανικών όπως προαναφέρεται παρουσιάζεται στο πείραμα ζύμωσης για συνθήκες προεπεξεργασίας υδρολύματος μέσω όξινης υδρόλυσης 109° C, χρόνου 20 λεπτών και ποσοστού στερεής μάζας 10 %. Η τιμή της απόδοσης παραγωγής ηλεκτρικού οξέος είναι 0,88 gηλεκτρικού οξέος / gστερεής μάζας και οργανικών οξέων 1,26 gοργανικών οξέων / gστερεής μάζας. Εντούτοις στην παρούσα μελέτη οι μέγιστες αποδόσεις οι οποίες λαμβάνονται υπόψη είναι του υδρολύματος προκατεργασίας με όξινη υδρόλυση 109° C, 20 λεπτών και 5 % στερεής μάζας καθώς και του υδρολύματος προεπεξεργασίας 116° C, 10 λεπτών και 5 % στερεής μάζας. Η επιλογή των συνθηκών αυτών συγκριτικά με την συνθήκη μέγιστης απόδοσης οφείλεται στο ποσοστό της στερεής μάζας που χρησιμοποιήθηκε κατά την επεξεργασία. Λογικά στην περίπτωση του ποσοστού 10 % στερεής μάζας θα αναμενόταν μεγαλύτερη, σχεδόν διπλάσια απόδοση στην απελευθέρωση σακχάρων και κατά συνέπεια στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος σε σχέση με το ποσοστό 5 % στερεής μάζας. Παρόλα αυτά στην περίπτωση των πειραματικών αποτελεσμάτων της παρούσης έρευνας δεν συμβαίνει. Οι αποδόσεις παραγωγής ηλεκτρικού οξέος για τις προαναφερόμενες συνθήκες όξινης υδρόλυσης είναι συγκριτικά παρόμοιες με τιμές 0,76 gηλεκτρικού οξέος / gστερεής μάζας και 0,77 gηλεκτρικού οξέος / gστερεής μάζας αντίστοιχα. Οι

αποδόσεις παραγωγής συνολικών οργανικών οξέων είναι 1,26 g οργανικών οξέων / g στερεής μάζας και 1,20 g οργανικών οξέων / g στερεής μάζας αντίστοιχα.

Η χαμηλότερη απόδοση παρουσιάζεται στο πείραμα ζύμωσης για συνθήκες προεπεξεργασίας υδρολύματος 109° C, χρόνου 10 λεπτών, ποσοστού στερεής μάζας 5 %. Οι αποδόσεις παραγωγής είναι 0,44 g ηλεκτρικού οξέος / g στερεής μάζας και 0,77 g οργανικών οξέων / g στερεής μάζας.

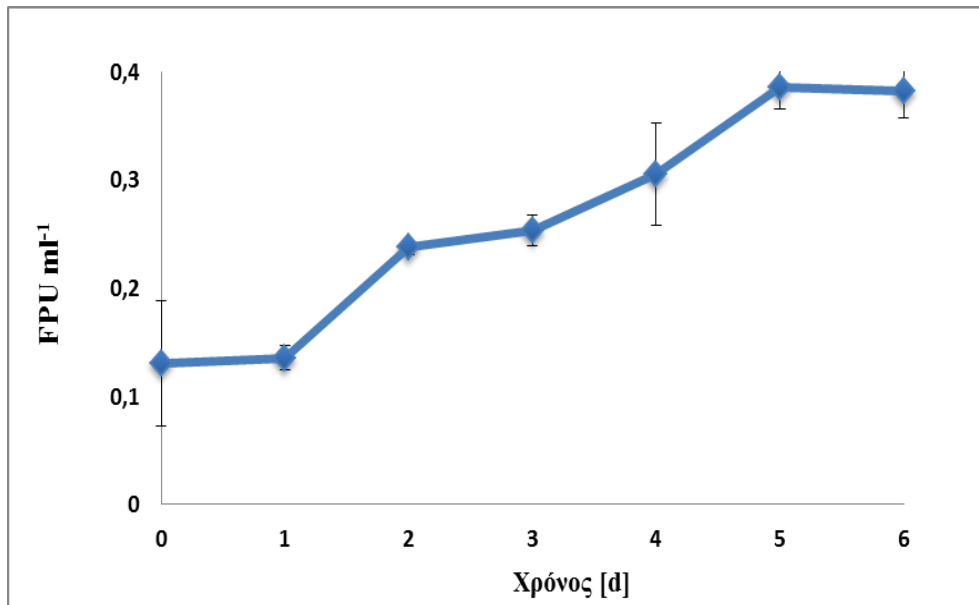


Διάγραμμα 15: Γραφική παράσταση απόδοσης ηλεκτρικού οξέος και άλλων οργανικών για τα διάφορα πειράματα ζυμώσεων

3.6 Ανάπτυξη μικροοργανισμού *Trichoderma reesei*

Η ενζυμική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *T.reesei* επίσης μελετήθηκε. Ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε βιομέσο ανάπτυξης με αναλογία υγρού – αέρα 1:5. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης λαμβάνονταν δείγματα καθημερινώς για την εύρεση του χρόνου μέγιστης ενζυμικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού. Το συμπέρασμα μέγιστης ενζυμικής δραστηριότητας εξάγεται μέσω της κατασκευής καμπύλης χρόνου σε συνάρτηση με την ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 2.0 mg σακχάρου (γλυκόζης) σε 1 h σε pH 5,5 και θερμοκρασία 50° C. Η καμπύλη παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 18 για χρονικό διάστημα παραγωγής 6 ημερών. Σύμφωνα με το Διάγραμμα η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα παραγωγής κυτταρινασών και ημικυταρρινασών του μικροοργανισμού παρουσιάζεται σε χρόνο 5 ημερών. Σε μετέπειτα στάδιο της έρευνας το οποίο δεν αναφέρεται στην παρούσα

μελέτη πραγματοποιείται ενζυμική υδρόλυση για περαιτέρω απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων στο υδρόλυμα με σκοπό μεγιστοποίηση της παραγωγής ηλεκτρικού οξέος



Διάγραμμα 16: Γραφική παράσταση ενζυμική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *T. reesei* σε σχέση με το χρόνο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πτυχιακή μελετήθηκε η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος κατά την ζύμωση σακχάρων τα οποία προέρχονται από όξινη υδρόλυση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης αποβλήτων βιομηχανίας παρασκευής χυμού (φλούδας μάντορας). Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε μέσω του μεταβολισμού του μικροοργανισμού *Actinobacillus succinogenes*. Για την παρασκευή των υδρολυμάτων ζύμωσης ακολουθήθηκε φυσικοχημική επεξεργασία των φλουδών οι οποία περιλάμβανε εξαγωγή αιθέριων ελαίων και πηκτίνης καθώς και όξινη υδρόλυση. Σύμφωνα με τα εξαγόμενα αποτελέσματα η μέγιστη απόδοση παραγωγής ηλεκτρικού οξέος παρατηρήθηκε για συνθήκες όξινης υδρόλυσης 109° C, χρόνου 20 λεπτών και ποσοστού στερεής μάζας 5 % καθώς και για συνθήκες 116° C, χρόνου 10 λεπτών και ποσοστού στερεής μάζας 5 %. Η μέγιστη απόδοση παραγωγής η οποία επιτεύχθηκε ήταν 0,76 ηλεκτρικού οξέος / στερεής μάζας και 0,77 ηλεκτρικού οξέος / στερεής μάζας αντίστοιχα.

Συμπερασματικά η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω ζυμώσεων με τη χρήση υδρολυμάτων τα οποία υπέστην προεπεξεργασία όπως είναι η όξινη υδρόλυση αποτελεί μια διεργασία με υψηλή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Μέσω των ζυμώσεων οι οποίες διεξήχθησαν επιτυγχάνεται βελτιστοποίηση του σταδίου όξινης υδρόλυσης για την μέγιστη απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων η οποία θα οδηγήσει σε υψηλή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Παρόλα αυτά η διαδικασία της ζύμωσης οδηγεί επιπλέον σε παραγωγή παραπροϊόντων οξέων τα οποία δυσκολεύουν μελλοντικό διαχωρισμό και ανάκτηση του παραγόμενου ηλεκτρικού οξέος. Καταλήγοντας η παραγωγή ενός τέτοιου βιοδιυλιστηρίου σε βιομηχανική κλίμακα για την αξιοποίηση των αποβλήτων φλουδών εσπεριδοειδών θα οδηγήσει σε σημαντική μείωση των αποβλήτων από τη χυμοποίηση, σε ανάκτηση διάφορων χρήσιμων προϊόντων προστιθέμενης αξίας ενώ επιπλέον η διεργασία θα συμβάλει στη μείωση των αερίων του θερμοκηπίου.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η ανάπτυξη διεργασιών παραγωγής ηλεκτρικού οξέος μέσω βιολογικών μετατροπών με τη χρήση λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας ως υπόστρωμα αποτελεί μια ελπιδοφόρα τεχνική η οποία θα οδηγήσει σε σημαντική μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Εκτός από την ακαδημαϊκή έρευνα οι τεχνικές αυτές ήδη χρησιμοποιούνται σε μεγάλες βιομηχανίες παραγωγής ηλεκτρικού οξέος. Παρόλα αυτά η έρευνα βιοπαραγωγής βρίσκεται σε αρχικό στάδιο. Η τεχνολογία βιοτεχνολογικής παραγωγής έχει το πλεονέκτημα μείωσης της διάθεσης αποβλήτων στο περιβάλλον ενώ ταυτόχρονα μειώνει τα αέρια του θερμοκηπίου.

Στην παρούσα έρευνα κατά την φυσικοχημική επεξεργασία των φλουδών από εσπεριδοειδή πραγματοποιείται μια σειρά από διαδικασίες. Ακολούθως μετά την όξινη υδρόλυση λαμβάνεται το υδρόλυμα που δημιουργείται στο οποίο βρίσκονται ελεύθερα τα ζυμώσιμα σάκχαρα κατά τη διάσπαση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης. Η ενέργεια αυτή οδηγεί στην εκμετάλλευση του υδρολύματος μόνο μετά από επεξεργασία όξινης υδρόλυσης. Ενισχυτική και προσοδοφόρα μετέπειτα διεργασία είναι η χρήση της φλούδας των εσπεριδοειδών η οποία απομένει κατά την όξινη υδρόλυση καθώς και το υδρόλυμα όξινης υδρόλυσης (το οποίο περιέχει ακόμα αδιάσπαστους πολυσακχαρίτες) σε υδρόλυση με ένζυμα για περαιτέρω ανάκτηση ζυμώσιμων σακχάρων και κατά συνέπεια αύξηση της παραγωγικότητας του ηλεκτρικού οξέος. Στη συνέχεια οι απομείναντες φλούδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αναερόβια χώνευση με σκοπό την παραγωγή βιοαερίου.

Μια άλλη διεργασία η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί είναι η ανάκτηση του ηλεκτρικού οξέος μέσω των διεργασιών ζύμωσης. Η ανάκτηση και ο διαχωρισμός από τα παραπροϊόντα οργανικών τα οποία παράγονται, μέσω ηλεκτροδιάλυσης και κρυστάλλωσης, μπορεί να μελετηθεί όπως και η γενετική τροποποίηση του μικροοργανισμού για παραγωγή μικρότερων ποσοτήτων σε οξικό, φορμικό και γαλακτικό οξύ.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akhtar, J., Idris, A. & Abd. Aziz, R., 2014. Recent advances in production of succinic acid from lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), pp.987–1000.
- Angel Siles López, J., Li, Q. & Thompson, I.P., 2010. Biorefinery of waste orange peel. *Critical reviews in biotechnology*, 30(1), pp.63–69.
- Bampidis, V.A. & Robinson, P.H., 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 128(3-4), pp.175–217.
- Bechthold, I. et al., 2008. Succinic acid: A new platform chemical for biobased polymers from renewable resources. *Chemical Engineering and Technology*, 31(5), pp.647–654.
- Cheng K., Zhao X.B., Zeng J., Z.J.A., 2012. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), pp.246–256.
- Das, A. et al., 2007. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), pp.505–512. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-1206-3>.
- Faravash, R.S. & Ashtiani, F.Z., 2007. The effect of pH, ethanol volume and acid washing time on the yield of pectin extraction from peach pomace. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(10), pp.1177–1187.
- Garzon, C. & Hours, R., 1992. Citrus Waste: An alternative substrate for pectinase production in solid - state culture. , 39, pp.93–95.
- Grohmann K., Cameron R.G., B.B.S., 1995. Fractoination and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. , 8524(95), pp.129–141.

- Guettler, M. V, Rumler, D. & Jainf, M.K., 1999. Succinic-Acid-Producing Strain From the Bovine Rurnen. *International journal of systematic bacteriology*, 49(1 999), pp.207–216. Available at: <http://ijs.sgmjournals.org/content/49/1/207.short>.
- Van Heerden, I. et al., 2002. Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresource Technology*, 81(1), pp.71–76.
- Jansen, M.L.A. & van Gulik, W.M., 2014. Towards large scale fermentative production of succinic acid. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, pp.190–197. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.07.003>.
- Jong, E. De & Jungmeier, G., 2015. *Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries*,
- Leung, C.C.J. et al., 2012. Utilisation of waste bread for fermentative succinic acid production. *Biochemical Engineering Journal*, 65, pp.10–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.010>.
- Li, J. et al., 2010. Enhanced production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* with reductive carbon source. *Process Biochemistry*, 45(6), pp.980–985. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.001>.
- Li, Q., Siles, J.A. & Thompson, I.P., 2010. Succinic acid production from orange peel and wheat straw by batch fermentations of *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(3), pp.671–678.
- Martinez, D. et al., 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature biotechnology*, 26(5), pp.553–560. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1403>.

- McKinlay, J.B. et al., 2010. A genomic perspective on the potential of *Actinobacillus succinogenes* for industrial succinate production. *BMC genomics*, 11(1), p.680. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/680>.
- Oberoi, H.S. et al., 2010. Ethanol production from orange peels: twostage hydrolysis and fermentation studies using optimized parameters through experimental design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), pp.3422–3429.
- OTHMAN, A.B., 2013. Investigation on the Potential of Orange Peel Waste in the Production of Useful Homemade Solution.
- Pateraki, C. et al., 2016. *Actinobacillus succinogenes*: Advances on succinic acid production and prospects for development of integrated biorefineries. , 0.
- Peciulyte, A. et al., 2014. Morphology and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 are affected by the physical and structural characteristics of cellulosic substrates. *Fungal Genetics and Biology*, 72, pp.64–72. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.07.011>.
- Pourbafrani, M. et al., 2010. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource Technology*, 101(11), pp.4246–4250.
- Rivas, B. et al., 2008. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), pp.2380–2387.
- Samuelov, N. et al., 1999. Whey fermentation by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for production of a succinate-based animal feed additive. *Applied and environmental microbiology*, 65(5), pp.2260–3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=91330&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Song, H. & Lee, S.Y., 2006. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), pp.352–361.
- Talebnia F. Pourbafrani M., L.M.T.M.J., 2008. Optimization study of citrus wastes saccharification by dilute-acid hydrolysis. *BioResources*, 3(1), pp.108–122. Available at: http://www.ncsu.edu/bioresources/BioRes_03_1.html#Talebnia_Citrus_Wastes.
- Tan, J.P. et al., 2014. Insight into biomass as a renewable carbon source for the production of succinic acid and the factors affecting the metabolic flux toward higher succinate yield. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53(42), pp.16123–16134.
- Union, I., Pure, O.F. & Chemistry, A., 1987. International Union of Pure Commission on Biotechnology * Measurement of. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), pp.257–268. Available at: <http://www.iupac.org/publications/pac/1987/pdf/5902x0257.pdf>.
- Vellend, M. et al., 2002. Insights into Actinobacillus succinogenes Fermentative Metabolism in a Chemical Defined Growth Medium. *DNA Sequence*, (517).
- Vemuri, G., Eiteman, M. & Altman, E., 2002. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), pp.1715–1727. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/content/full/68/4/1715?view=long&pmid=11916689>.
- Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Grohmann, K., et al., 2007. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource Technology*, 98(8), pp.1596–1601.
- Wilkins, M.R., Widmer, W.W. & Grohmann, K., 2007. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by Saccharomyces cerevisiae to produce ethanol. *Process Biochemistry*, 42(12), pp.1614–1619.

- Xi, Y.L. et al., 2013. Ultrasonic pretreatment and acid hydrolysis of sugarcane bagasse for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, pp.1779–1785.
- Ylittervo, P., 2008. Production of ethanol and biomass from orange peel waste by *Mucor indicus*. *Biotechnology*.
- Zeikus, J.G., Jain, M.K. & Elankovan, P., 1999. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, pp.545–552.
- Zheng, P. et al., 2010. Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource technology*, 101, pp.7889–7894. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570141>.