

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας IV: Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

Αποικοδόμηση υγρών αποβλήτων
ελαιουργείου με χρήση
λιγνινολυτικών μυκήτων

Εμμανουέλα Γκατζάρου

Επιβλέπων: Ευάγγελος Τόπακας (Λέκτορας Ε.Μ.Π)

Αθήνα 2014



Ευχαριστίες

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

Ολοκληρώνοντας την διπλωματική μου εργασία, θα ήθελα να εκφράσω ειλικρινώς τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της έγκαιρα και υπό τις καλύτερες δυνατές συνθήκες.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο της διπλωματικής εργασίας, Λέκτορα του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κ. Ευάγγελο Τόπακα, για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές στα στάδια εκπόνησης και συγγραφής της διπλωματικής εργασίας. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ. Δημήτριο Κέκο και κ. Φραγκίσκο Κολίση.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Αναστασία Ζέρβα για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον της καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου, την προθυμία της να βοηθήσει στην επίλυση κάθε απορίας μου και το πνεύμα αισιοδοξίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους υποψήφιους διδάκτορες και τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη βοήθειά τους σε διάφορα, τεχνικά και μη, θέματα που προέκυψαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων όσο και για το φιλικό περιβάλλον στον εργαστηριακό χώρο για τους μήνες της συνεργασίας μας

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου για την πλήρη υποστήριξη που μου προσέφερε όχι μόνο κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	i
Abstract.....	ii
Θεωρητικό Μέρος	
1. Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείου	
1.1. Εισαγωγή.....	1
1.2. Ο ελαιόκαρπος.....	3
1.3. Παραγωγή του ελαιολάδου και τύποι ελαιουργείων.....	3
1.4. Σύγκριση διφασικών-τριφασικών ελαιουργείων.....	9
1.5. Απόβλητα ελαιουργείου.....	10
1.5.1. Στερεά απόβλητα.....	10
1.5.2. Αέρια απόβλητα.....	11
1.5.3. Υγρά απόβλητα.....	11
1.6. Περιβαλλοντικές επιπτώσεις ΥΑΕ.....	13
1.6.1. Φαινολικές ενώσεις.....	15
1.7. Μέθοδοι επεξεργασίας ΥΑΕ.....	16
1.7.1. Φυσικοχημικές μέθοδοι.....	16
1.7.1.1. Προσθήκη ηλεκτρολυτών.....	16
1.7.1.2. Αντιδραστήριο Fenton.....	16
1.7.1.3. Προσρόφηση.....	17
1.7.1.4. Εξάτμιση.....	17
1.7.1.5. Θερμική συμπύκνωση.....	17
1.7.1.6. Υπερδιήθηση – Αντίστροφη ώσμωση.....	18
1.7.1.7. Ηλεκτρολυτική οξείδωση.....	18
1.7.2. Αναερόβια ζύμωση των ΥΑΕ για παραγωγή βιοαερίου.....	19
1.7.3. Συγκομποστοποίηση.....	20
1.7.4. Παραγωγή βιοαποδομήσιμων υλικών.....	21
1.7.5. Παραγωγή στερεών καυσίμων.....	21
1.7.6. Ελεγχόμενη εφαρμογή σε εδαφικούς αποδέκτες.....	21
1.7.7. Βιολογική επεξεργασία: αποδόμηση ΥΑΕ με τη χρήση μικροοργανισμών.....	22
1.8. Αξιοποίηση ΥΑΕ στην παραγωγή ενζύμων.....	23
2. Λιγνινολυτικοί Μύκητες	
2.1. Εισαγωγή.....	24
2.1.1. Μύκητες λευκής σήψης.....	27
2.1.2. Μύκητες καστανόχρωμης σήψης.....	28
2.1.3. Μύκητες ελαφράς σήψης.....	28
2.2. Λιγνινοκυτταρίνη.....	29
2.3. Λιγνινολυτικά ένζυμα.....	30
2.3.1. Λακκάση.....	32

2.3.2. Υπεροξειδάση της λιγνίνης.....	34
2.3.3. Υπεροξειδάση του μαγγανίου.....	36
2.4. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές λιγνινολυτικών ενζύμων.....	37
2.5. Καλλιεργούμενα εδώδιμα μανιτάρια.....	39

Πειραματικό Μέρος

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Υλικά.....	42
3.1.1. Μικροοργανισμοί.....	42
3.1.2. Χημικά αντιδραστήρια –Αναλώσιμα υλικά.....	42
3.1.3. Συσκευές και όργανα.....	42
3.1.4. Θρεπτικά υποστρώματα.....	43
3.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα.....	43
3.2. Μέθοδοι.....	44
3.2.1. Μέτρηση ενεργότητας λακκάσης.....	44
3.2.2. Μέτρηση ολικών φαινολών	45
3.2.2.1. Μέτρηση ολικών φαινολών βιομάζας.....	45
3.2.3. Αποχρωματισμός αποβλήτου.....	47
3.2.4. Μέτρηση βιομάζας και pH.....	47
3.2.5. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων.....	47
3.2.6. Μέτρηση ενεργότητας υπεροξειδασών.....	48
3.2.7. Μέτρηση ενεργότητας λιπάσης.....	49
3.3. Κατεργασία αποβλήτου	50
3.4. Προκαλλιέργειες μικροοργανισμών.....	50
3.5. Υγρές καλλιέργειες μικροοργανισμών.....	50

Αποτελέσματα και Συμπεράσματα

4. Αποτελέσματα

4.1. Στερεές καλλιέργειες.....	52
4.2. Πείραμα Α: Εύρεση βέλτιστου pH καλλιέργειας.....	53
4.2.1. Εισαγωγή.....	53
4.2.2. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης.....	53
4.2.3. Μετρήσεις βιομάζας.....	56
4.2.4. Μέτρηση φαινολικών ενώσεων.....	56
4.2.5. Αποχρωματισμός αποβλήτου.....	57
4.3. Πείραμα Β: Εύρεση βέλτιστου ρυθμού ανάδευσης.....	58
4.3.1. Εισαγωγή.....	58
4.3.2. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης.....	58
4.3.3. Μετρήσεις βιομάζας.....	61
4.3.4. Μέτρηση φαινολικών ενώσεων.....	62
4.3.5. Αποχρωματισμός αποβλήτου.....	63
4.3.6. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων.....	63

4.4. Πείραμα Γ: Εύρεση βέλτιστης πηγής αζώτου.....	64
4.4.1. Εισαγωγή.....	64
4.4.2. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης.....	65
4.4.3. Μετρήσεις βιομάζας.....	67
4.4.4. Μέτρηση φαιολικών ενώσεων.....	69
4.4.5. Αποχρωματισμός αποβλήτου.....	70
4.4.6. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων.....	71
4.4.7. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης της λιγνίνης.....	73
4.4.8. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης του μαγγανίου.....	75
4.4.9. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας λιπάσης.....	78
4.4.10. Μέτρηση φαιολικών ενώσεων βιομάζας.....	80
5. Συζήτηση –Γενικά συμπεράσματα	
5.1. Εισαγωγή.....	81
5.2. Πείραμα Α: Εύρεση βέλτιστου pH καλλιέργειας.....	81
5.3. Πείραμα Β: Εύρεση βέλτιστου ρυθμού ανάδευσης.....	82
5.4. Πείραμα Γ: Εύρεση βέλτιστης πηγής αζώτου.....	83
5.5. Γενικά συμπεράσματα.....	86
5.6. Μελλοντικοί στόχοι.....	87
Βιβλιογραφία.....	89

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η αποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείου (ΥΑΕ) με τη χρήση λιγνινολυτικών μυκήτων και συγκεκριμένα των μυκήτων λευκής σήψης *Pleurotus citrinopileatus*, *Irpex lacteus* και *Ganoderma lucidum*.

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου χαρακτηρίζονται από σκούρο χρώμα, έντονη μυρωδιά, υψηλό οργανικό φορτίο και μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων, χαρακτηριστικά τα οποία τα καθιστούν ιδιαίτερα τοξικά για το περιβάλλον και λόγω των οποίων κρίνεται απαραίτητη η επεξεργασία τους προτού αυτά διατεθούν στους χερσαίους και υδάτινους αποδέκτες. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η βιολογική μέθοδος επεξεργασίας των ΥΑΕ με τη χρήση μικροοργανισμών, όπως οι μύκητες. Οι μύκητες λευκής σήψης έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν τη λιγνίνη, τη δεύτερη πιο άφθονη οργανική ουσία πάνω στη γη μετά την κυτταρίνη. Το γεγονός αυτό βρίσκει άμεση εφαρμογή στην αποικοδόμηση των ΥΑΕ καθώς τα ΥΑΕ και συγκεκριμένα οι φαινολικές ενώσεις που περιέχουν έχουν δομικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά της λιγνίνης. Οι μύκητες λευκής σήψης αποικοδομούν τη λιγνίνη εκκρίνοντας ένζυμα, τα οποία συνολικά αναφέρονται ως «λιγνινάσες». Οι λιγνινάσες μπορούν να χωριστούν σε α) φαινολικές οξειδάσες, στις οποίες ανήκουν οι λακκάσες (Lac) και β) υπεροξειδάσες, στις οποίες ανήκουν οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP) και οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP).

Βασικός στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών καλλιέργειας των μικροοργανισμών για να επιτευχθεί η υψηλότερη αποδόμηση του αποβλήτου. Μελετήθηκαν οι ακόλουθοι 3 παράγοντες: pH καλλιέργειας, ρυθμός ανάδευσης και πηγή αζώτου. Η επιλογή των βέλτιστων συνθηκών για την καλλιέργεια του κάθε στελέχους έγινε με κριτήριο την ενεργότητα των λιγνινολυτικών ενζύμων, την παραγόμενη βιομάζα, τη διάσπαση των φαινολικών ενώσεων και τον αποχρωματισμό του αποβλήτου.

Τα αποτελέσματα της εργασίας είναι πολύ ενθαρρυντικά για τους δύο εκ των τριών εξεταζόμενων μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* επέφεραν αποχρωματισμό του αποβλήτου της τάξης του 80% καθώς και μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων μέχρι και 90%. Η παραχθείσα βιομάζα έφτασε τα 145 mg ml⁻¹ καλλιέργειας στην περίπτωση του στελέχους *P. citrinopileatus* και τα 77 mg ml⁻¹ καλλιέργειας για το στέλεχος *I. lacteus*. Ακόμα, οι δύο μικροοργανισμοί παρουσίασαν προτίμηση στο εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού ως πηγή αζώτου. Η αποικοδόμηση του αποβλήτου οφείλεται στη δράση των λιγνινολυτικών ενζύμων, τα οποία στην περίπτωση του *P. citrinopileatus* ήταν κυρίως οι λακκάσες ενώ για το *I. lacteus* ήταν οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης και οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου. Το στέλεχος *G. lucidum* δεν κατάφερε να αναπτυχθεί ικανοποιητικά ώστε να αποικοδομήσει το απόβλητο σε καμία από τις συνθήκες καλλιέργειας που δοκιμάστηκαν.

Abstract

The present diploma thesis examines the degradation of olive oil mill wastes by ligninolytic fungi. The white rot fungi that are specifically examined are *Pleurotus citrinopileatus*, *Irpex lacteus* and *Ganoderma lucidum*.

Olive oil mill wastes (OOMW) are generally characterized by their dark color, intense smell of olive oil, high organic load and high concentration of polyphenolic compounds. Due to these characteristics, OOMW constitute an important pollutant factor for the environment and therefore, must be treated before disposal in the natural recipients. The biological treatment, employing the use of microorganisms such as fungi, is considered very interesting. Ligninolytic fungi are capable of degrading lignin, the second most abundant organic polymer on Earth after cellulose. Ligninolytic fungi can be used in the degradation of OOMW by breaking down biodegradable chemical species present in OOMW, such as phenolic compound, which have similar structural features with lignin. White rot fungi degrade lignin by secreting enzymes collectively termed “ligninases”. Ligninases can be classified as either phenol oxidases [laccase (Lac)] or peroxidases [lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP)].

The main purpose of the thesis is the determination of the optimal conditions for the cultivation of the microorganism, in order to achieve the highest degradation of the OOMW. The parameters tested were: pH of the culture, stirring rate and nitrogen source. The choice of the optimal conditions was based upon the enzymatic activity of ligninolytic enzymes, the fungal biomass, the decomposition of the phenolic compounds and the decolorization of the OOMW.

The results are very encouraging concerning two out of the three microorganisms tested. *P. citrinopileatus* and *I. lacteus* achieved significant decolorization (80%) and reduction of phenolics (90%). The fungal biomass was almost 145 mg ml⁻¹ in case of *P. citrinopileatus* and 77 mg ml⁻¹ for *I. lacteus*. Moreover, both white rot fungi preferred corn steep liquor as a nitrogen source. As mentioned before, ligninolytic enzymes are responsible for the degradation of OOMW. *P. citrinopileatus* secretes mainly laccase, while *I. lacteus* secretes mostly peroxidases. To conclude, *G. lucidum* was not able to grow enough in order to degrade OOMW.

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1.
Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείου

1.1. Εισαγωγή

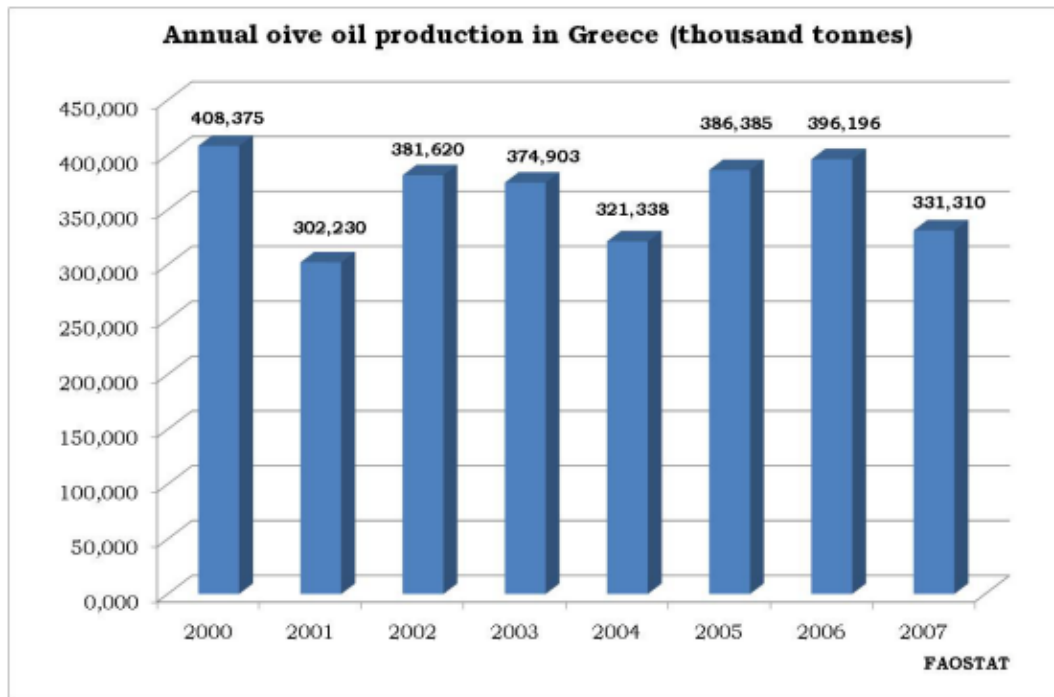
Εδώ και χιλιετίες, το κατ'εξοχήν δέντρο του μεσογειακού χώρου, η ελιά, συνυπάρχει με τους λαούς της Μεσογείου, έχει συνδεθεί με την καθημερινότητα και τις συνήθειες τους και έχει αφήσει τα ίχνη της σε όλους του πολιτισμούς που αναπτύχθηκαν στα παράλια της. Η ελαιουργία αποτελεί μία από τις παραδοσιακές καλλιέργειες, που ασκούνται στην περιοχή της Μεσογείου, παράλληλα με την αμπελουργία και την καλλιέργεια των δημητριακών.

Η καλλιέργεια του ελαιολάδου χάνεται στα βάθη των αιώνων. Απολιθώματα ελιάς έχουν βρεθεί στο Λιβόρνο της Ιταλίας που χρονολογούνται 20 εκατομμύρια χρόνια πριν, ενώ η καλλιέργεια της ελιάς υπολογίζεται ότι ξεκίνησε στον ευρύτερο χώρο της Μεσογείου, πριν από περίπου 7.000 χρόνια. Όσον αφορά στην Ελλάδα, οι πρώτες μαρτυρίες για την καλλιέργειά της στον ελλαδικό χώρο, σύμφωνα με τα αρχαιολογικά ευρήματα, ξεκίνησε στην Κρήτη, πριν από 3.500 χρόνια (Κυριτσάκης, 2007).

Σήμερα σε όλη την υδρόγειο υπάρχουν περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδενδρα από τα οποία το 95% περίπου καλλιεργούνται στη λεκάνη της Μεσογείου η οποία διαθέτει άριστες εδαφικές και κλιματικές συνθήκες για την ανάπτυξη της ελιάς. Η μεγαλύτερη παραγωγή ελαιολάδου προέρχεται από τη νότια Ευρώπη, τη βόρειο Αφρική και την Εγγύς Ανατολή. Από την Ευρωπαϊκή παραγωγή, το 93% προέρχεται από την Ισπανία, την Ιταλία και την Ελλάδα. Η Ισπανία κατέχει την πρώτη θέση στην παραγωγή και την εξαγωγή ελιών και ελαιολάδου ενώ στο έδαφός της καλλιεργούνται περισσότερα από 300 εκατομμύρια ελαιόδεντρα. Η Ιταλία είναι η δεύτερη ελαιοπαραγωγική χώρα της Ευρώπης, με τα 2/3 της παραγωγής της να ανήκει στην κατηγορία “εξαιρετικά παρθένο”, με 37 είδη με Προστατευμένη Ονομασία Προέλευσης τα οποία παράγονται σε όλη την έκτασή της.

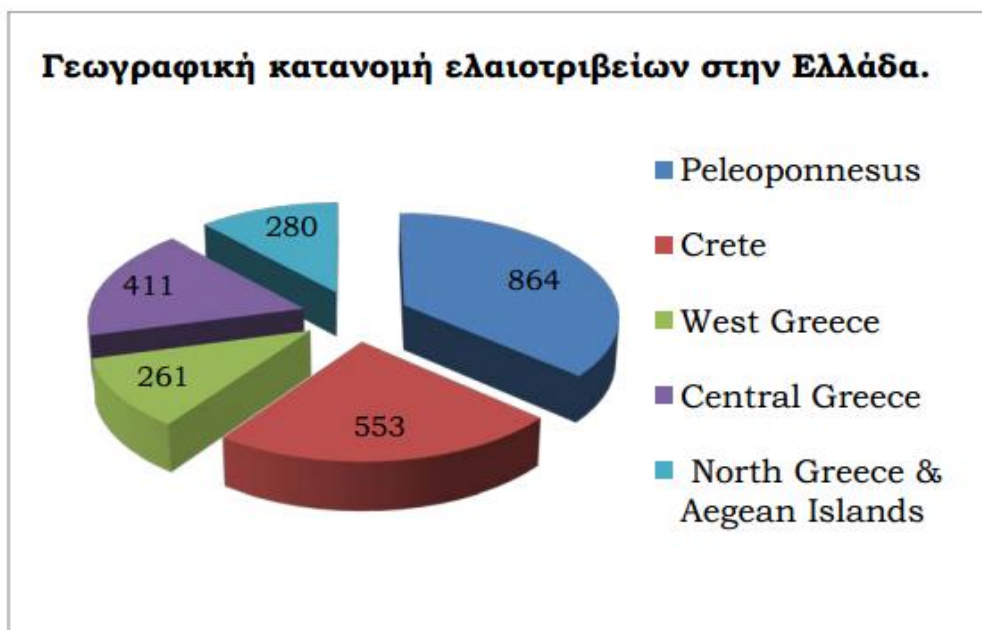
Ο ελαιοπαραγωγικός κλάδος αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους τομείς της γεωργικής παραγωγής της χώρας μας. Η Ελλάδα είναι η τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα σε παγκόσμιο επίπεδο, ενώ η ποιότητα του ελληνικού ελαιολάδου εκτιμάται ως ανώτερη των λοιπών ελαιοπαραγωγικών χωρών. Στο έδαφός της καλλιεργούνται περισσότερα από 132 εκατομμύρια ελαιόδεντρα, από τα οποία παράγονται περίπου 350.000 τόνοι ελαιολάδου ετησίως, εκ των οποίων το 82% ανήκει στην κατηγορία εξαιρετικά-παρθένο (Prosodol).

Πίνακας 1.1: Ετήσια παραγωγή ελαιολάδου στην Ελλάδα (FAOSTAT)



Περίπου η μισή από την ετήσια ελληνική παραγωγή ελαιολάδου εξάγεται προς τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, κυρίως στην Ιταλία, η οποία απορροφά περίπου τα $\frac{3}{4}$ του συνόλου της ελληνικής εξαγωγής. Οι πιο σημαντικές ελαιοπαραγωγικές περιοχές στην Ελλάδα είναι η Πελοπόννησος, η οποία παράγει το 65% της συνολικής παραγωγής, καθώς επίσης και η Κρήτη και τα νησιά του Αιγαίου και του Ιονίου (Prosodol).

Πίνακας 1.2: Γεωγραφική κατανομή ελαιοτριβείων στην Ελλάδα



Πίνακας 1.3: Νομοί της Ελλάδας με το μεγαλύτερο αριθμό ελαιόδεντρων.
(Γεν. Γραμμ. Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας Ελλάδος)

A/a	Νομοί	Αριθμός ελαιοδένδρων
1	Μεσσηνίας	13.545.000
2	Ηρακλείου	13.378.000
3	Λακωνίας	10.936.000
4	Λέσβου	10.567.000
5	Χανίων	7.321.000
6	Ηλείας	6.914.000
7	Φθιώτιδας	6.382.000
8	Ευβοίας	5.530.000
9	Μαγνησίας	5.106.000
10	Αιτωλοακαρνανίας	4.627.000
11	Κέρκυρας	3.718.000
12	Αχαΐας	3.338.000

1.2. Ο ελαιόκαρπος

Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη, και αποτελείται από το περικάρπιο και το ενδοκάρπιο. Το περικάρπιο αποτελείται από δύο τμήματα, την επιδερμίδα και το μεσοκάρπιο το οποίο αποτελεί το 65-83% του νωπού βάρους του καρπού. Κατά την ωρίμανση του καρπού η επιδερμίδα μετατρέπεται από ανοιχτό πράσινο σε σκούρο μαύρο χρώμα. Η μέση σύσταση του ελαιοκάρπου είναι: 50% νερό, 22% λάδι, 19% υδατάνθρακες, 1.6% πρωτεΐνες, καθώς και άλλα σημαντικά συστατικά όπως πηκτίνες, οργανικά οξέα, χρωστικές, πολυφαινόλες και ανόργανα συστατικά. Πολλά από αυτά τα συστατικά συναντώνται και στα απόβλητα που παράγονται κατά τη παραγωγική διαδικασία του ελαιολάδου. Ο καρπός περνάει διάφορες φάσεις έως ότου φτάσει ένα μέγιστο βάρος από τον Οκτώβριο μέχρι τα μέσα Νοέμβρη για τις περισσότερες ποικιλίες. Από εκεί και έπειτα ο καρπός αρχίζει να χάνει υγρασία με αποτέλεσμα την αύξηση της ελαιοπεριεκτικότητάς του. Το 96-98% του λαδιού στον ελαιόκαρπο συγκεντρώνεται στο περικάρπιο (Ποντίκης, 2000).

1.3. Παραγωγή του ελαιολάδου και τύποι ελαιουργείων

Στη λεκάνη της Μεσογείου, στις ημέρες μας, δύο διαφορετικές διαδικασίες παραγωγής ελαιολάδου χρησιμοποιούνται ευρέως, οι οποίες βασίζονται στη φυγοκέντρωση. Τα φυγοκεντρικά συστήματα διακρίνονται στα συστήματα τριών και δύο φάσεων, ανάλογα με τα προϊόντα που δίνουν στο τέλος της επεξεργασίας του ελαιοκάρπου. Επιπλέον σε κάποιες περιοχές, ανάμεσα τους και περιοχές της Ελλάδας, εφαρμόζεται ακόμα η παραδοσιακή διαδικασία, κατά την οποία το ελαιολάδο εξάγεται με πίεση του ελαιοκάρπου στα υδραυλικά πιεστήρια. Τα τρία αυτά συστήματα διαφέρουν σημαντικά ως προς την ποσότητα των υγρών και

στερεών αποβλήτων, καθώς και των παραπροϊόντων που παράγουν και λιγότερο ως προς την ποιότητα του ελαιολάδου (Μπλίκια, 2009).

Η επεξεργασία του ελαιολάδου αποτελείται από επτά βήματα:

1. Παραλαβή του καρπού

Μετά τη συγκομιδή οι ελιές παραδίδονται στις μεταποιητικές μονάδες για επεξεργασία το ταχύτερο δυνατόν. Η μεταφορά τους γίνεται σε πλαστικά τελάρα (κλούβες) με οπές αερισμού ή πλαστικούς σάκους. Σε περίπτωση που χρειάζεται να αποθηκευτεί ο καρπός θα πρέπει να είναι για μικρό χρονικό διάστημα σε χώρο με καλό αερισμό.

2. Πλύσιμο

Οι ελιές τοποθετούνται αρχικά σε χοάνη παραλαβής ελαιοκάρπου και στη συνέχεια με μεταφορική ταινία οδηγούνται στο αποφυλλωτήριο, όπου απομακρύνονται τα φύλλα και άλλα φερτά υλικά. Ακολουθεί πλύσιμο για την απομάκρυνση ξένων υλών (σκόνη, χώμα, κ.λ.π.). Το νερό μπορεί να ανακυκλωθεί μετά από κατακρήμνιση ή διήθηση των στερεών συστατικών του. Απαιτούνται περίπου 100-120 l νερού για την πλύση 1000 kg ελαιοκάρπου. Μετά το πλύσιμο ακολουθεί η άλεση του καρπού σε ελαιόμυλο ή σπαστήρα.

3. Σπάσιμο-άλεση ελαιοκάρπου

Στα παραδοσιακά ελαιοτριβεία η άλεση του καρπού γίνεται με κυλινδρικές μυλόπετρες. Στις σύγχρονες μονάδες χρησιμοποιούνται μεταλλικοί μύλοι, σφυρόμυλοι και σπαστήρες με οδοντωτούς δίσκους. Εάν οι ελιές που υποβάλλονται σε επεξεργασία είναι παγωμένες ή πολύ ξηρές, προστίθεται μια μικρή ποσότητα νερού (100-150 l ανά 1000 kg καρπού).

4. Μάλαξη

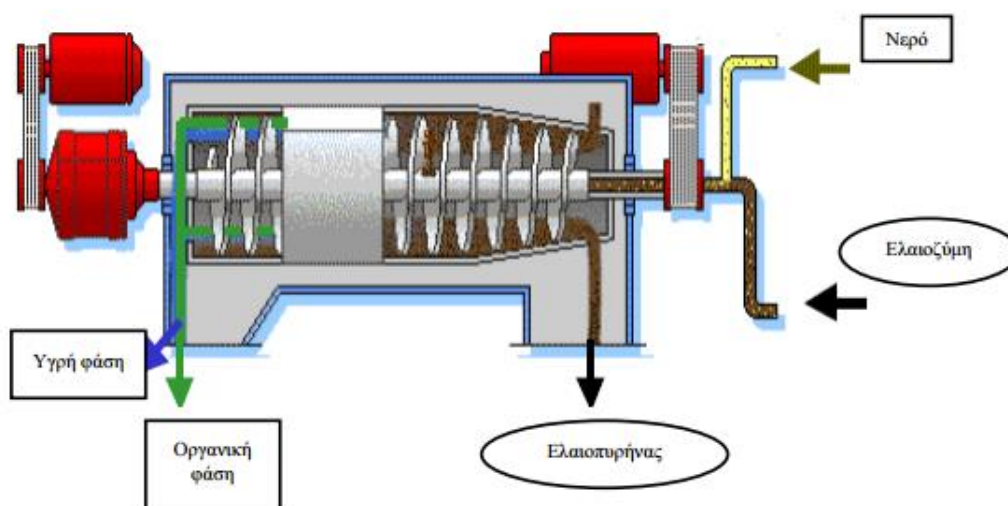
Μετά την άλεση, η ελαιοζύμη αναμιγνύεται στο μαλακτήρα μετά την προσθήκη ζεστού νερού. Η μάλαξη αποτελεί βασικό στάδιο της επεξεργασίας και συντελεί στην συνένωση των μικρών ελαιοσταγονιδίων με μεγαλύτερες σταγόνες λαδιού. Για τη διευκόλυνση της διαδικασίας η ελαιοζύμη θερμαίνεται στους 28-30°C. Στο μαλακτήρα προστίθεται νερό μέχρι και 10 % της ποσότητας της ελαιοζύμης, πριν την εξαγωγή του ελαιόλαδου σε διφασικό ή τριφασικό φυγοκεντρικό σύστημα.

5. Παραλαβή του ελαιόλαδου

Η παραδοσιακή μέθοδος της πίεσης και η διαδικασία των τριών φάσεων παράγουν το παρθένο ελαιόλαδο και δύο τύπους αποβλήτων: τα υγρά απόβλητα (κατσίγαρος) και τα στερεά απόβλητα (ελαιοπυρήνας). Η παραδοσιακή μέθοδος είναι μια ασυνεχής διαδικασία που διαφοροποιείται σε δύο φάσεις με την πίεση των αλεσμένων καρπών. Η υγρή φάση (μίγμα νερού/λαδιού) διαχωρίζεται αργότερα

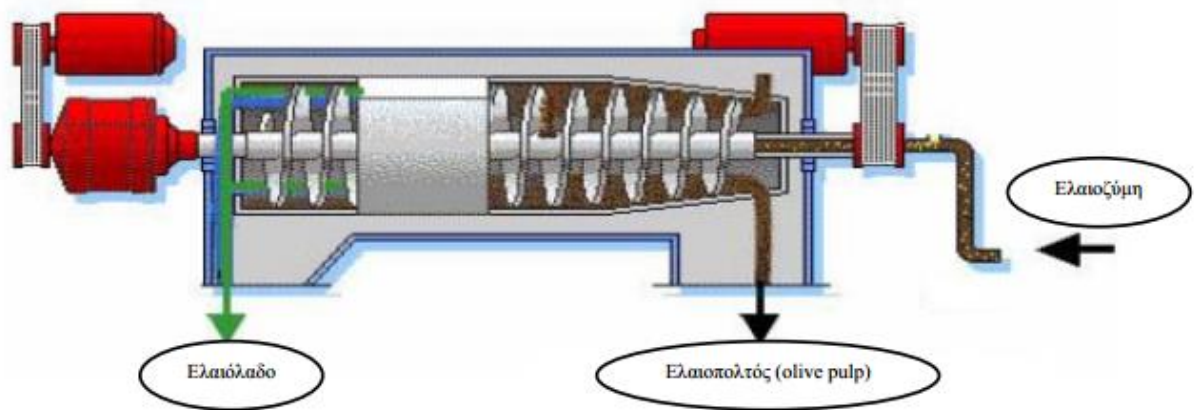
προκειμένου να ληφθεί το ελαιόλαδο. Υπολογίζεται ότι από 1000 kg καρπού παράγονται περίπου 350 kg ελαιοπυρήνα (περιεκτικότητα σε υγρασία 25 %) και περίπου 450 kg υγρά απόβλητα (απόνερα). Εντούτοις, αν και είναι πιο οικολογική, η τεχνική αυτή είναι ασυνεχής, γεγονός που αποτελεί μειονέκτημα για τη σύγχρονη βιομηχανία.

Η τριφασική διαδικασία είναι μια συνεχής διαδικασία που έχει αντικαταστήσει την παραδοσιακή μέθοδο. Χρονολογείται από τη δεκαετία του 1970-1980. Οι αλεσμένες ελιές τοποθετούνται σε ένα τριφασικό φυγοκεντρικό διαχωριστήρα (decanter) όπου τα διαφορετικά μέρη (ελαιόλαδο, απόνερα, ελαιοπυρήνας) διαχωρίζονται με την επίδραση της φυγοκέντρου δύναμης. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι οι μεγάλες ποσότητες ύδατος που απαιτούνται και συνεπώς η παραγωγή σημαντικού όγκου υγρών αποβλήτων που προκαλούν ρύπανση. Υπολογίζεται ότι από 1000 kg καρπού, παράγονται 500 kg ελαιοπυρήνα (περιεκτικότητα σε υγρασία 50 %) και 1200 kg υγρά απόβλητα (Μπλίκια, 2009).



Εικόνα 1.1: Ο τριφασικός διαχωριστήρας (www.theoliveoilsource.com)

Πριν μερικά χρόνια εμφανίστηκε στην αγορά το διφασικό σύστημα (αποκαλούμενο και «οικολογικό σύστημα»). Σε αυτή τη διαδικασία, τα τελικά προϊόντα είναι το ελαιόλαδο και ο ελαιοπυρήνας στον οποίο ενσωματώνονται τα απόνερα. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα του συστήματος είναι η μειωμένη κατανάλωση νερού και η έλλειψη υγρών αποβλήτων. Υπολογίζεται ότι κατά την επεξεργασία 1000 kg καρπού παράγονται 800 kg περίπου υγρής ελαιοπυρήνας. Σοβαρό, όμως, μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ο ελαιοπυρήνας που προκύπτει έχει αυξημένη υγρασία και είναι δύσκολος στο χειρισμό, στη μεταφορά και την επεξεργασία. Επιπλέον, ξηραίνεται με αργό ρυθμό και έχει υψηλό ρυπαντικό φορτίο (Μπλίκια, 2009).



Εικόνα 1.2: Ο διφασικός διαχωριστήρας (www.theoliveoilsource.com)

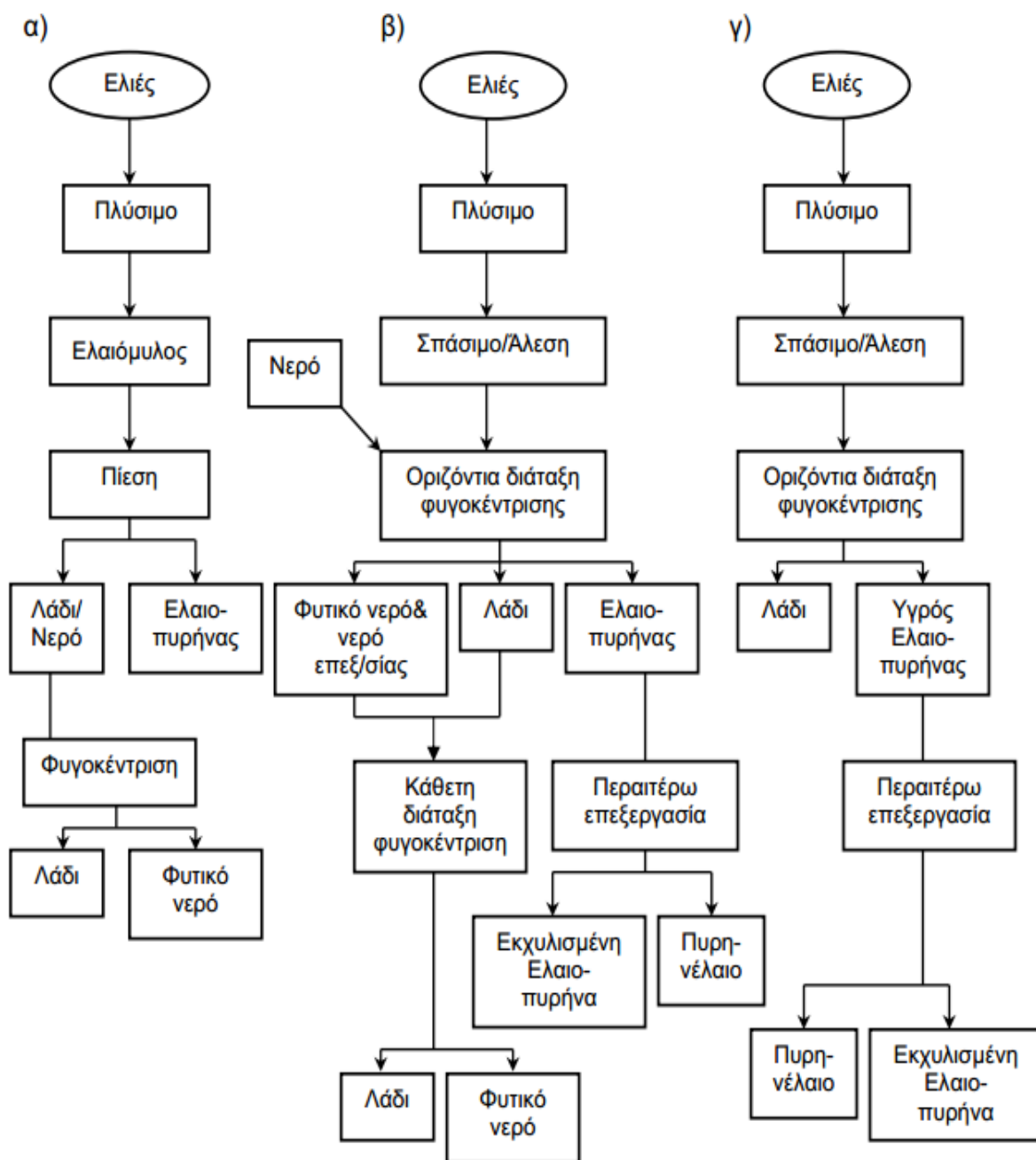
6. Καθαρισμός του ελαιόλαδου

Τα στερεά σωματίδια (τεμαχίδια σάρκας, φλοιού, θρύμματα πυρηνόξυλου, κλπ) που βρίσκονται διαλυμένα στην υγρή φάση απομακρύνονται με τη χρήση παλινδρομικά κινούμενων κοσκίνων (κόσκινα απολάσπωσης). Σημειώνεται ότι το βάρος των στερεών σωματιδίων υπολογίζεται σε ποσοστό 0.5-1 % επί του συνολικού βάρους της υγρής φάσης.

7. Τελικός διαχωρισμός

Ο τελικός διαχωρισμός του ελαιόλαδου από τα φυτικά υγρά γίνεται με τη χρήση φυγοκεντρικών ελαιοδιαχωριστήρων.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι τρεις διαφορετικές επεξεργασίες παραλαβής ελαιόλαδου (παραδοσιακή, τριφασική και διφασική) διαφέρουν σημαντικά ως προς τον όγκο και τη σύσταση των αποβλήτων που παράγουν, ενώ υπάρχουν και μικρές διαφορές και ως προς την ποιότητα του ελαιόλαδου (Μπλίκια, 2009). Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ των τριών διαδικασιών.



Εικόνα 1.3: Διάγραμμα ροής των τριών διαφορετικών διαδικασιών παραγωγής ελαιόλαδου
 α) παραδοσιακή β) τριών φάσεων γ) δύο φάσεων (Morillo et al., 2009)

Πίνακας 1.4: Γενικά χαρακτηριστικά ΥΑΕ (Sierra et al., 2001)

Παράμετροι	Τιμές
pH	4.5-6
Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο, (BAO ₅ g/l)	35-100
Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο, (XAO g/l)	40-195
Ολικός οργανικός άνθρακας, (TOC g/l)	22-64
Λίπη (g/l)	0.3-23
Ανόργανα στοιχεία (g/l)	5-14
Πολυφαινόλες (g/l)	3-24
N (g/l)	5-15
P (g/l)	0.3-1.1
K (g/l)	2.7-7.2
Ca (g/l)	0.12-0.75
Mg (g/l)	0.10-0.40
Na (g/l)	0.04-0.90
Στερεά %	5.5-17.6

Αξίζει να σημειωθεί, ότι πέρα από την μέθοδο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του ελαιολάδου, τεράστια σημασία στα τελικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου, αλλά και των αποβλήτων-παραπροϊόντων που το συνοδεύουν έχουν και άλλοι παράγοντες. Αυτοί είναι (Cabrera et al., 1996; Niaounakis and Halvadakis, 2006):

1. Οι εδαφικές και κλιματολογικές συνθήκες κάθε περιοχής
2. Η ποικιλία των ελαιόδεντρων
3. Το στάδιο ωρίμανσης του καρπού κατά την συλλογή του
4. Η χρήση παρασιτοκτόνων και λιπασμάτων στους ελαιώνες
5. Ο τρόπος συγκομιδής και αποθήκευσης του ελαιοκάρπου. Η αποθήκευση μπορεί να αλλάξει τα βιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αποβλήτου, καθώς παρατηρείται έντονη βιολογική δραστηριότητα (αύξηση της οξύτητας), καθώς επίσης και φυσικοχημικές μεταβολές όπως η καθίζηση των στερεών.
6. Το σημείο όπου γίνεται η δειγματοληψία για τον χαρακτηρισμό των αποβλήτων (αν είναι αμέσως μετά την παραγωγή ή αφού περάσουν κάποιες ημέρες, επίσης αν είναι από ανοιχτή ή κλειστή δεξαμενή απόθεσης και τέλος αν είναι δείγμα επιφανειακό ή βάθους).

Αποτέλεσμα των προαναφερθέντων παραγόντων είναι οι μεγάλες διακυμάνσεις στα χαρακτηριστικά τόσο του ελαιολάδου όσο και των αποβλήτων- παραπροϊόντων που το συνοδεύουν, μεταξύ των διάφορων ελαιοπαραγωγικών περιοχών από χώρα σε χώρα, όπως και μεταξύ των ελαιοκομικών περιοχών.

1.4. Σύγκριση διφασικών-τριφασικών ελαιουργείων

Τα τελευταία χρόνια η παραγωγή του ελαιολάδου έχει γίνει εφικτή χωρίς την προσθήκη πόσιμου νερού και χωρίς την παραγωγή υγρών αποβλήτων, χάρη στην εφαρμογή των διαχωριστήρων δύο φάσεων. Τα πλεονεκτήματα των διφασικών ελαιουργείων έναντι των τριφασικών είναι τα εξής (Χρυσοβαλάντου, 2010):

1. Η δυναμικότητα των φυγοκεντρικών διατάξεων των δύο φάσεων σε σχέση με των τριών φάσεων είναι μεγαλύτερη, καθώς δεν απαιτείται προσθήκη νερού για την παραγωγή ελαιολάδου.
2. Δεν παράγουν υγρά απόβλητα κατά τη διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου
3. Ο διφασικός διαχωριστήρας είναι πιο απλός στην κατασκευή του, πιο αξιόπιστος κατά την λειτουργία του και πιο φθηνός έναντι του τριφασικού.
4. Η παραγωγικότητα σε ελαιόλαδο είναι λίγο μεγαλύτερη σε σχέση με την τριφασική λειτουργία, παρόλο το γεγονός ότι ο διφασικός ελαιοπυρήνας συγκρατεί περισσότερο λάδι έναντι του τριφασικού ελαιοπυρήνα.
5. Η ποιότητα του ελαιολάδου που προκύπτει από τη διφασική επεξεργασία είναι υψηλότερη, λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες και κυρίως σε διφαινόλες, ενώ είναι και σταθερότερο στην οξείδωση.
6. Το λειτουργικό κόστος της μονάδας είναι μικρότερο

Τα μειονεκτήματα της διφασικής λειτουργίας είναι τα ακόλουθα (Χρυσοβαλάντου, 2010):

1. Η παραγωγή του ημιστερεού ελαιοπολτού, ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλό οργανικό φορτίο και πρέπει να διατεθεί με ασφαλή τρόπο στο περιβάλλον.
2. Η υψηλή υγρασία του ελαιοπολτού, που δυσκολεύει τη μεταφορά, την αποθήκευση και τη διαχείριση του, ενώ ανεβάζει και το κόστος για την ξήρανσή του.
3. Η ανάκτηση του ελαιολάδου που περιέχεται στον πολτό είναι μία απαιτητική και ακριβή διαδικασία που απαιτεί και υψηλά ποσά ενέργειας (Κάλφας, 2007).

Ενώ στην Ισπανία η πλειονότητα των ελαιοτριβείων είναι διφασικά (Tsagaraki et al., 2006), στην Ελλάδα τα περισσότερα ελαιοτριβεία είναι φυγοκεντρικά τριών φάσεων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός, ότι ο υγρός ελαιοπυρήνας (σχετικής υγρασίας 55-75%) που παράγουν τα ελαιοτριβεία δύο φάσεων δεν είναι επεξεργάσιμος στα περισσότερα ελαιουργεία που λειτουργούν.

1.5. Απόβλητα ελαιουργείου

Στη βιομηχανία τροφίμων που σχετίζεται με την επεξεργασία του ελαιοκάρπου το κύριο προϊόν είναι το ελαιόλαδο. Τα δευτερεύοντα προϊόντα καλούνται απόβλητα όταν είναι τελείως άχρηστα ενώ όταν περιέχουν συστατικά χρήσιμα και αποτελούν αντικείμενο περαιτέρω επεξεργασίας καλούνται υποπροϊόντα ή παραπροϊόντα.

Ο ελαιοκάρπος κατά την επεξεργασία του στα ελαιουργεία, δίνει ορισμένα υποπροϊόντα (ελαιοπυρήνας, φύλλα των ελαιοδέντρων) και ταυτόχρονα παράγονται μεγάλες ποσότητες υγρών αποβλήτων με μεγάλο βιολογικό φορτίο.

Παρακάτω γίνεται αναλυτικότερη αναφορά σε κάθε κλάδο αποβλήτων .

1.5.1. Στερεά απόβλητα

Τα στερεά απόβλητα, τα οποία περιλαμβάνουν κλαδίσκους, φύλλα ελιάς, πέτρες και τον ελαιοπυρήνα, παράγονται κατά το στάδιο της συλλογής και της αποφύλλωσης του ελαιοκάρπου καθώς και της εξαγωγής του ελαιολάδου. Σύμφωνα με τον Γεωργακάκη (1994) και τους Eι and Karakaya (2009) παράγονται 3-5 kg ελαιοφύλλα κατά τη διάρκεια της αποφύλλωσης 100 kg ελαιοκάρπου στο ελαιοτριβείο. Τα κλαδέματα ελιάς αποτελούν μία εύκολα προσβάσιμη και φτηνή λιγνινοκυτταρινούχα πηγή, και υπολογίζεται ότι ετησίως παράγονται περί τους 3 τόνους ανά εκτάριο ελαιώνα.

Από την αρχαιότητα ακόμη, το ξύλο ελιάς χρησιμοποιούνταν ως καύσιμη ύλη και ως πρώτη ύλη σε ξύλινες κατασκευές λόγω της υψηλής ανθεκτικότητας του, ενώ τα φύλλα αποτελούσαν καλή ζωοτροφή (Φακλάρης και Σταματοπούλου, 1999). Σήμερα στον ελλαδικό χώρο κύρια πρακτική αποτελεί η καύση των ελαιοκλαδων στον αγρό ύστερα από το κλάδεμα, με αποτέλεσμα την ρύπανση της ατμόσφαιρας. Διάφοροι συγγραφείς θεωρούν τη διαχείριση αυτών των υπολειμμάτων εφικτή καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ζωοτροφή (Roig *et al.*, 2006). Τέλος, κάποιοι ερευνητές παρουσίασαν εναλλακτικούς τρόπους διαχείρισης των κλαδεμάτων και των φύλλων ελιάς όπως είναι η παραγωγή αιθανόλης ύστερα από υδρόλυση τους και η παραγωγή ενέργειας από βιομάζα (Spinnelli and Picchi, 2010).

Το σημαντικότερο στερεό παραπροϊόν είναι ο ελαιοπυρήνας ο οποίος παράγεται κατά το στάδιο του διαχωρισμού του πυρήνα από τη πάστα ελιάς και αποτελείται από το μείγμα καρπού και τη φλούδα της ελιάς. Η παραγόμενη ποσότητά και η σχετική του υγρασία διαφοροποιείται ανάλογα με τον τύπο του ελαιοτριβείου. Έτσι, σε ελαιοτριβεία κλασσικού τύπου από την επεξεργασία 1000 kg ελαιοκάρπου παράγονται 400 kg ελαιοπυρήνα με ποσοστό υγρασίας 30-35% ενώ σε φυγοκεντρικού τύπου τριών φάσεων παράγονται 500-600 kg ελαιοπυρήνα με ποσοστό υγρασίας 45-50% (Azbar *et al.*, 2004, Roig, 2006). Ο ελαιοπυρήνας του παραδοσιακού και του τριφασικού ελαιοτριβείου οδηγείται σε πυρηνελαιουργεία, στα οποία ξηραίνεται στους 60⁰ C και έπειτα από εκχύλιση με χρήση εξανίου παράγεται

πυρηνέλαιο, ελαιόλαδο κατώτερης ποιότητας, και πυρηνόξυλο το οποίο αποτελεί εξαιρετική καύσιμη ύλη. Ο ελαιοπυρήνας διφασικού ελαιοτριβείου ή απόβλητο διφασικού ελαιοτριβείου (ΑΔΕ) αποτελεί ξεχωριστή κατηγορία διότι δεν μπορεί να επεξεργαστεί από τα περισσότερα υπάρχοντα πυρηνελαιουργεία κυρίως λόγω της υψηλής σχετικής υγρασίας του, η οποία μπορεί να είναι πάνω από 65% λόγω των υγρών πλύσης που εμπεριέχονται από την εξαγωγή του ελαιολάδου (Χρυσοβαλάντου, 2010, Roig *et al.*, 2006). Η παραγόμενη ποσότητα αντιστοιχεί σε 800 kg ανά 1000 kg ελαιόκαρπου (Roig *et al.*, 2006). Χαρακτηρίζεται από έντονα δυσάρεστη οσμή, σκούρο χρώμα και σχετικά όξινο pH. Κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω επεξεργασία του πριν τη διάθεση του στο περιβάλλον διότι παρουσιάζει υψηλό οργανικό φορτίο και είναι ιδιαίτερα τοξικό.

1.5.2. Αέρια απόβλητα

Από την παραγωγική διαδικασία των ελαιοτριβείων, τα αέρια απόβλητα που παράγονται είναι τα καυσαέρια τόσο από την καύση του ελαιοπυρήνα, όσο και αυτά από τα μηχανήματα εσωτερικής καύσης. Θα μπορούσαν να θεωρηθούν αμελητέα χωρίς ωστόσο να υποτιμηθεί η επιβάρυνση που επιφέρουν στην ατμόσφαιρα. Αυτό δικαιολογείται αν ληφθούν υπόψη τα εξής:

- Τα ελαιοτριβεία σε πολύ μεγάλο ποσοστό χωροθετούνται εκτός των αστικών περιοχών και έτσι δεν κινδυνεύουν κατοικημένες περιοχές από τους αέριους ρύπους που ενδεχόμενα εκπέμπονται.
- Οι ποσότητες των αέριων αποβλήτων είναι πολύ μικρές σε σχέση με τον τεράστιο όγκο του ατμοσφαιρικού αποδέκτη και επομένως η επιβάρυνση που επιφέρουν σε αυτόν μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα.

1.5.3. Υγρά Απόβλητα

Στην περίπτωση της ελαιουργίας τα υγρά παραπροϊόντα γνωστά ως λιόζουμα, απόνερα ή κατσίγαρος, αποτελούν προϊόντα χωρίς εμπορική αξία, αλλά είναι πλούσια σε πολύτιμα συστατικά όπως σάκχαρα, πρωτεΐνες, υπολείμματα λαδιού, φαινολικές ουσίες, χρωστικές και χλωροφύλλες. Γενικά τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων αποτελούνται από 83-92% νερό, 4-16% οργανικά συστατικά και 1-2% ανόργανα συστατικά (Χατζηπαυλίδης, 1999). Το οργανικό κλάσμα αποτελείται από σάκχαρα (1-8%), ενώσεις N (0,5-2,4%), οργανικά οξέα (0,5-1,5%), λιπίδια (0,02-1%), καθώς και φαινόλες και πηκτίνες (1-1,5%) (Greco *et al.*, 1999).

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (ΥΑΕ) παράγονται κυρίως από φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία τριών φάσεων και προέρχονται από το υγρό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και του νερού που προστίθενται στην πλύση του καρπού, τη μάλαξη, τη φυγοκέντριση στον οριζόντιο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα και στον ελαιοδιαχωριστήρα κατά το διαχωρισμό του ελαιολάδου. Στη διεθνή βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των ΥΑΕ δίνονται διάφοροι όροι όπως olive mill waste-water

(OMW), olive press waste-water, olive vegetation water, olive vegetable water (OVW) (Fiestas Ros de Ursinos and Borja-Padilla, 1992).

Τα απόβλητα χαρακτηρίζονται από:

- Έντονα ιώδες-σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα
- Πολύ έντονη μυρωδιά ελαιολάδου
- Πολύ μεγάλο οργανικό φορτίο (τιμές COD μέχρι και 220g l⁻¹)
- Τιμές pH μεταξύ 3 και 6
- Υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα
- Μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων (από 0,5 έως 24g l⁻¹)
- Μεγάλη περιεκτικότητα σε στερεή ουσία

Πίνακας 1.5: Τυπική σύσταση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Παράμετρος	Vlyssides et al., 1996		Di Giovacchino & Mascolo, 1988	
	Πίεσης	3-φασικό	Πίεση	3-φασικό
Ολικά στερεά, g/l	99,7	63,5	129,7	61,1
Ολικά αιωρούμενα στερεά, g/l	4,51	2,80		
Ολικά πτητικά στερεά, g/l	87,2	57,4		
Στάχτη, g/l	9,69	6,13	20	6,4
Ολικός οργανικός άνθρακας, g/l	64,1	39,8		
Ολικό άζωτο Kjeldahl, g/l	1,15	0,76		
Φώσφορος (P ₂ O ₅), g/l	0,87	0,53		
pH	4,50	4,80	5,27	5,23
BOD ₅ , mg/l	68.700	45.500		
COD, mg/l	158.000	92.500	146.000	85.700
Ειδικό βάρος, g/cm ³	1,05	1,05	1,049	1,020
Αγωγιμότητα, mmhos/cm	18,0	12,0		
Ολικά σάκχαρα, g/l	25,9	16,1	35,8	15,9
Λίπη και έλαια, g/l	2,80	1,64	2,26	5,78
Πολυαλκοόλες, g/l	4,75	3,19		
Ολικές φαινόλες, g/l	17,2	10,6	6,2	2,7
Ταννίνες, g/l	6,74	4,01		
Κάλιο (K ₂ O), g/l	3,77	2,37	2,98	1,14
Νάτριο (Na ₂ O), mg/l	406	243	148	48,5
Ασβέστιο (CaO), mg/l	382	271	227	96,6
Σίδηρος (FeO), mg/l	48,3	32,0	42,3	18,0
Μαγνήσιο (MgO), mg/l	74,0	50,0	322	149
Πυρίτιο (SiO ₂), mg/l	28,6	18,0		
Ολικό θείο, mg/l	101	63,0		
Χλώριο, mg/l	219	124		
Mn, mg/l	18,2	12,0	5,32	1,55
Zn, mg/l	19,7	12,0	3,57	2,06
Cu, mg/l	10,50	6,00	3,12	1,59

1.6. Περιβαλλοντικές επιπτώσεις ΥΑΕ

Ένα από τα μεγαλύτερα περιβαλλοντικά προβλήματα που εμφανίζεται στις ελαιοπαραγωγικές χώρες είναι η απόρριψη των αποβλήτων ελαιουργίας, τα οποία εμφανίζουν ιδιαίτερη τοξική δράση και διαθέτουν υψηλή ρυπογόνο δύναμη. Η συνήθης πρακτική στον Ελλαδικό χώρο είναι η ανεξέλεγκτη διάθεση τους στους υδάτινους αποδέκτες είτε απευθείας στο έδαφος χωρίς προηγούμενη επεξεργασία, με αποτέλεσμα την ρύπανση των υπόγειων υδροφόρων οριζόντων. Σημαντικοί λόγοι που επιτείνουν το σημαντικό πρόβλημα της αποτελεσματικής επεξεργασίας τους είναι η εποχικότητα, η μεγάλη διασπορά των ελαιοτριβείων και οι οικονομικά δαπανηροί τρόποι διαχείρισης (Ouzounidou et al. 2010).

Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα ρύπανσης στις ελαιοκομικές περιοχές αλλά και ένα σημαντικό πρόβλημα προς επίλυση για τη γεωργική βιομηχανία. Ο κυριότεροι λόγοι είναι (Prosodol):

- Η μεγάλη παραγωγή αποβλήτων μέσα σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, τα οποία θα πρέπει, ιδανικά, να κατεργαστούν ή να διατεθούν με ασφάλεια για το περιβάλλον πριν αρχίσει η επόμενη παραγωγική περίοδος. Αν και οι παραγόμενοι όγκοι αποβλήτων εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως την ποικιλία του ελαιόκαρπου, το στάδιο ωριμότητας, το χρόνο αποθήκευσης πριν την ελαιοποίηση, το χρόνο διαχωρισμού του ελαιόλαδου από την ελαιοζύμη, το διαθέσιμο νερό στο ελαιοτριβείο και το κόστος προμήθειάς του, σε γενικές γραμμές για κάθε 100 kg ελαιόκαρπου παράγονται 100-120 kg υγρών αποβλήτων, με μέση ημερήσια τιμή ανά ελαιουργείο 15-20 τόνους.
- Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αποβλήτων, κάποια από τα οποία μπορούν να προκαλέσουν σημαντική επιβάρυνση στους αποδέκτες που διατίθενται (π.χ. ευτροφισμός, εκδήλωση τοξικών φαινομένων στην υδρόβια πανίδα, φυτοτοξικότητα, αισθητική υποβάθμιση).
- Το ιδιαίτερα υψηλό οργανικό φορτίο των αποβλήτων, το οποίο αποτελείται από ενώσεις άμεσα διασπώμενες (π.χ. σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα, πρωτεΐνες), από ενώσεις δύσκολα διασπώμενες (π.χ. μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες, πολυφαινόλες). Οι πολυφαινόλες περιέχονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα απόβλητα και είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση βιοτοξικών φαινομένων στους φυσικούς αποδέκτες.
- Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων περιέχουν επίσης πολλά ανόργανα συστατικά (ενώσεις του αζώτου και του φωσφόρου, νάτριο, κάλιο, σίδηρο, κ.α.). Αν και τα ανόργανα αυτά συστατικά δεν είναι τοξικά, εν τούτοις η μεγάλη συγκέντρωσή τους και η επαναλαμβανόμενη διάθεσή τους μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στο περιβάλλον.

Η απευθείας διάθεση των αποβλήτων ελαιοτριβείου στο υπάρχον αποχετευτικό δίκτυο είναι απαγορευμένη, καθώς δημιουργεί πολλά προβλήματα. Επίσης σε όλες τις ελαιοπαραγωγές χώρες, υπάρχει αυστηρή νομοθεσία για την ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων ελαιοτριβείων στους φυσικούς αποδέκτες. Στον

παρακάτω πίνακα φαίνονται τα όρια της εθνικής νομοθεσίας για τη διάθεση υγρών αποβλήτων ελαιουργείου στο περιβάλλον.

Πίνακας 1.6: Οριακές τιμές εκρεόντων (σύμφωνα με ΥΑ 179182/656, ΦΕΚ 582/2-7-1979)

	Διάθεση σε επιφανειακά νερά	Διάθεση στη θάλασσα	Διάθεση στο αποχετευτικό
pH	6-9	6-9	6-9
BOD ₅ (mg/l)	40	40	500
COD (mg/l)	120	120	1000
Ολικά διαλελυμένα στερεά (mg/l)	40	50	500
Λάδι και λίπη (mg/l)	5	5	40
Φαινόλες (mg/l)	0,5	0,5	5

Γενικά η διάθεση των αποβλήτων μπορεί να καταστρέψει την ικανότητα αυτοκαθαρισμού των συστημάτων και να δημιουργήσει μια σειρά από προβλήματα όπως:

- Οπτική ρύπανση και προβλήματα δυσοσμίας.
- Επιπτώσεις στα ύδατα και τους υδρόβιους οργανισμούς (Kapellakis et al., 2007).
 - Προβλήματα ευτροφισμού.
 - Δημιουργία ανοξικών συνθηκών.
 - Αδιαπέρατο φιλμ (συσσωρευμένα λίπη στην επιφάνεια των υδάτων που εμποδίζουν τις ακτίνες του ήλιου να εισχωρήσουν στην υδάτινη στήλη)
 - Χρωματισμό φυσικών υδάτων (λόγω της οξείδωσης και του πολυμερισμού των τανινών).
- Επιπτώσεις στο έδαφος
 - Αλλαγές στο πορώδες του εδάφους (Niaounnakis and Halvadakis, 2006).
 - Μικροβιοστατική κ μικροβιοκτόνο δράση
 - Φυτοτοξική δράση.
 - Ύπαρξη πολυφαινόλων.
 - Αύξηση αλάτων.
 - Παρουσία οργανικών οξέων (π.χ. οξικό και φορμικό οξύ (D' Annibale et al., 2003)).

Ιδιαίτερη αναφορά σε αυτό το σημείο πρέπει να γίνει στο περιεχόμενο των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου σε φαινολικές ενώσεις.

1.6.1. Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες συνδεδεμένες με έναν ή περισσότερους βενζολικούς δακτυλίους. Βρίσκονται στα φυτά και είναι μέρος του αμυντικού τους μηχανισμού, για την προστασία τους, από έντομα και παθογόνους μικροοργανισμούς (Vermerris and Nickolson, 2006).

Η ποσότητά τους στον ελαιόκαρπο εξαρτάται κυρίως από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες και το στάδιο ωριμότητάς τους. Άγουρες ελιές έχουν και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ελαιοευρωπεΐνη (η οποία είναι το κύριο φαινολικό συστατικό της ελιάς) (Ποντίκης, 2000).

Οι πολυφαινόλες είναι υδατοδιαλυτές ενώσεις και κατά την παραγωγή του ελαιολάδου μεταφέρονται κυρίως στην υδάτινη φάση. Η ελαιοευρωπεΐνη βρίσκεται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στα απόβλητα, κάτι που οφείλεται στην υδρόλυση που υφίσταται προς υδροξυτυροσόλη και ελενολικό οξύ κατά την παραγωγική διαδικασία. Στα απόβλητα ελαιοτριβείου έχουν ανιχνευτεί πάνω από τριάντα φαινολικές ενώσεις. Σύμφωνα με τον Hamdi (1992), οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα απόβλητα ελαιοτριβείου διακρίνονται σε:

- a) Φαινολικά μονομερή, φλαβονοειδή, μη αυτοοξειδούμενες ταννίνες και άλλες ενώσεις με $MB < 10kDa$
- b) Μεσαίου και μεγάλου μοριακού βάρους ($MB > 10 kDa$) σκουρόχρωμα πολυμερή, τα οποία προέρχονται από τον πολυμερισμό και την αυτοοξείδωση των φαινολικών ενώσεων της πρώτης ομάδας

Γενικά οι οργανικές ουσίες των ΥΑΕ μπορούν να διαχωριστούν σε ενώσεις άμεσα διασπώμενες (π.χ. σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα), βιοαποδομήσιμα πολυμερή (πρωτεΐνες, ημικυτταρίνες) και δύσκολα διασπώμενα συστατικά όπως μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες και φαινολικές ενώσεις (Οιχαλιώτης και Ζερβάκης, 1999). Παρά το ότι το πιο σημαντικό από ποσοτική άποψη τμήμα του οργανικού κλάσματος καταλαμβάνουν τα σάκχαρα, από ποιοτική άποψη οι πολυφαινόλες και οι λιπαρές ουσίες είναι τα πιο σημαντικά συστατικά, διότι προσδίδουν στα ΥΑΕ ανεπιθύμητες ιδιότητες (χρώμα, φυτοτοξικότητα κ.α.).

Η παρουσία των φαινολικών ενώσεων στα απόβλητα ελαιοτριβείου είναι ίσως το σημαντικότερο εμπόδιο για την αποτοξικοποίηση του αποβλήτου. Ωστόσο πολλές επιστημονικές εργασίες αποδεικνύουν την χρησιμότητα αυτών των ενώσεων στην ανθρώπινη υγεία, αφού παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και καρδιοπροστατευτική δράση και θα μπορούσαν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών (Vermerris and Nickolson, 2006).

1.7. Μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Το πρόβλημα της ρύπανσης του περιβάλλοντος από την απόρριψη των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων ερευνάται ήδη από την δεκαετία του '50. Διάφορα πειράματα και μεθοδολογίες έχουν εφαρμοστεί στην προσπάθεια εξεύρεσης μιας ασφαλούς και αποτελεσματικής λύσης για τη διαχείριση των αποβλήτων των ελαιοτριβείων, χωρίς όμως να έχουν βρεθεί λύσεις ευρείας αποδοχής. Κατά καιρούς έχουν δοκιμασθεί διάφορες μέθοδοι επεξεργασίας όπως συνοψίζονται από τους Οιχαλιώτη και Ζερβάκη (1999, 2000) και Niaounakis and Halvadakis (2004):

- Φυσικοχημικές μέθοδοι
- Αναερόβια ζύμωση των ΥΑΕ για παραγωγή βιοαερίου (βιομεθανοποίηση)
- Συγκομποστοποίηση
- Παραγωγή βιοαποδομήσιμων υλικών
- Παραγωγή στερεών καυσίμων
- Ελεγχόμενη εφαρμογή σε εδαφικούς αποδέκτες
- Βιολογικές επεξεργασίες-αποδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μικροοργανισμών

1.7.1. Φυσικοχημικές μέθοδοι

Διάφορες φυσικοχημικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν κυρίως πειραματικά στο παρελθόν προσπάθησαν να δώσουν λύσεις στη διαχείριση των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων. Οι χειρισμοί αυτοί παρατίθενται στις παραγράφους που ακολουθούν.

1.7.1.1. Προσθήκη ηλεκτρολυτών

Η πιο παλιά και απλή φυσικοχημική μέθοδος αντιμετώπισης του προβλήματος είναι η προσθήκη διαφόρων πολυηλεκτρολυτών, όπως $\text{Ca}(\text{OH})_2$ και CaO . Η χρήση των παραπάνω βοηθά τη ρύθμιση του pH των ΥΑΕ και επιτυγχάνει τη δέσμευση των διαλυμένων οργανικών υλών από τα κατακρημνιζόμενα άλατα. Η μέθοδος αυτή ενώ μπορεί να προκαλέσει μείωση του οργανικού φορτίου των ΥΑΕ κατά 60-70%, μειονεκτεί λόγω του στερεού υπολείμματος που παράγεται μετά το πέρας της επεξεργασίας τους (σε ποσοστό περί το 20% της αρχικής ποσότητας των αποβλήτων).

1.7.1.2. Αντιδραστήριο Fenton

Μια άλλη μέθοδος είναι η επεξεργασία των ΥΑΕ με το αντιδραστήριο Fenton. Η χημική οξείδωση του οργανικού φορτίου που προκαλείται, επιτυγχάνεται μέσω των ριζών υδροξυλίου, οι οποίες σχηματίζονται από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ένα σιδηρούχο άλας ($\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$) (Baldrian et al. 2006). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι δύσκολο να εφαρμοστεί για την αποδόμηση αποβλήτων υψηλού φαινολικού φορτίου εξαιτίας της ύπαρξης υδροξυομάδων στον αρωματικό τους δακτύλιο που τους προσδίδει σταθερότητα. Επίσης, η διάσπαση του οργανικού

φορτίου συνοδεύεται από παραγωγή τοξικών συστατικών, ενώ τέλος είναι δύσκολο να καθορισθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την πραγματοποίηση της αντίδρασης Fenton (όπως το pH, η θερμοκρασία, οι αρχικές συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του σιδηρούχου άλατος) (Gerňjak et al. 2003).

1.7.1.3. Προσρόφηση

Η μέθοδος της προσρόφησης στηρίζεται στην προσθήκη ενεργού άνθρακα σε ΥΑΕ, προκαλώντας τον αποχρωματισμό αυτών. Αποτελέσματα ερευνών αναφέρουν ελαφριά αφαίρεση των χρωστικών ουσιών των υγρών αποβλήτων μετά από προσρόφηση ενεργού άνθρακα σε δόσεις μέχρι 10 g l^{-1} αποβλήτου (Shammas 1984). Ωστόσο, η μέθοδος έχει μικρή αποτελεσματικότητα και χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό.

1.7.1.4. Εξάτμιση

Στην προσπάθεια διαχείρισης των ΥΑΕ αρκετοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τη μέθοδο της εξάτμισης. Με την συγκεκριμένη μέθοδο τα απόβλητα τοποθετούνται σε μεγάλες τεχνητές δεξαμενές ώστε με τη βοήθεια της ηλιακής ενέργειας να επιτυγχάνεται εξάτμιση και αποξήρανση των ΥΑΕ, το δε στερεό υπόλειμμα που απομένει έχει τη δυνατότητα λόγω συστάσεως να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα. Ο Escolano Bueno (1975) ήταν από τους πρώτους που εφάρμοσε την μέθοδο, ισχυριζόμενος ότι μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε ελαιοτριβεία μεσαίου μεγέθους (παραγωγή ΥΑΕ έως 3.000 τόνους ανά χρόνο). Ο μεγάλος όγκος των δεξαμενών που απαιτείται, το μεγάλο χρονικό διάστημα (7-8 μήνες) που χρειάζεται για να φτάσουμε στο στάδιο της αποξήρανσης, η παραγωγή δυσάρεστων οσμών και το υψηλό κόστος μεταφοράς των ΥΑΕ από τα ελαιοτριβεία στις δεξαμενές εξάτμισης, καθιστούν την καθολική εφαρμογή της μεθόδου αυτής πρακτικά αδύνατη για την ολοκληρωμένη διαχείριση των ΥΑΕ (Cabrerá et al. 1996). Η μέθοδος αυτή μπορεί να τύχει εφαρμογής σε περιοχές με ξηροθερμικό κλίμα, όπως η Κρήτη, όπου παρατηρήθηκαν σχετικά ικανοποιητικά αποτελέσματα (Μαρίνος 1991), με τη βασική όμως προϋπόθεση της τοποθέτησης - λειτουργίας των εξατμισοδεξαμενών σε περιοχές απομακρυσμένες από οικισμούς.

1.7.1.5. Θερμική συμπύκνωση

Η εφαρμογή της μεθόδου θερμικής συμπύκνωσης βρίσκεται ακόμη σε πειραματικό στάδιο. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου αυτής χρησιμοποιούνται ειδικοί εξατμισοποιητές, με τους οποίους επιχειρείται συμπύκνωση των ΥΑΕ με εξάτμιση. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η μείωση του όγκου των

αποβλήτων (έως 75%), η επανάκτηση του λαδιού που περιέχεται στα ΥΑΕ σε ποσοστό 0.1-0.3% και η δυνατότητα χρησιμοποίησης του εξατμισμένου συμπυκνωμένου νερού στο ίδιο ελαιοτριβείο (Μιχελάκης 2000). Παρόλα αυτά, το μεγάλο κόστος εφαρμογής της μαζί με τη διαχείριση του στερεού υπολείμματος που παράγεται προβάλλουν ως τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής.

1.7.1.6. Υπερδιήθηση – Αντίστροφη ώσμωση

Μια άλλη μέθοδος επεξεργασίας είναι η υπερδιήθηση, κατά την οποία γίνεται χρήση μεμβρανών, ικανών να διαχωρίσουν τα διαλυμένα από τα αιωρούμενα συστατικά των ΥΑΕ με βάση τις διαστάσεις των μεγαλομοριακών οργανικών ενώσεων. Η ωθούσα δύναμη διαχωρισμού είναι η υδραυλική πίεση, η ίδια που εφαρμόζεται και στη μέθοδο αντίστροφης ώσμωσης. Η ημιπερατή μεμβράνη που χρησιμοποιείται στα συστήματα αντίστροφης ώσμωσης επιτρέπει τη διόδου του νερού, ενώ είναι αδιαπέραστη από τα περισσότερα οργανικά και ανόργανα συστατικά των αποβλήτων. Οι ωσμωτικές μεμβράνες χρησιμοποιούνται για τη συγκράτηση αμινοξέων, βιταμινών, απλών σακχάρων ή και ανόργανων συστατικών. Από τα επεξεργασμένα απόβλητα με μια από τις δύο παραπάνω μεθόδους μπορούν να παραληφθούν ανθοκυανίνες, φυσικές χρωστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ το συμπύκνωμα της υπερδιήθησης κατόπιν ειδικής ξηράνσεως έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή (Ισραηλίδης & Κωδούνης 1982). Οι μέθοδοι είναι πρακτικά δύσκολο να εφαρμοστούν λόγω του μεγάλου ενεργειακού κόστους και κόστους αγοράς των ημιπερατών μεμβρανών.

1.7.1.7. Ηλεκτρολυτική οξείδωση

Ο Βλυσσίδης (1997) πειραματίστηκε με μια άλλη φυσικοχημική μέθοδο που βασίζεται στην ηλεκτρολυτική οξείδωση των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων χρησιμοποιώντας ως άνοδο Ti/Pt και ως κάθοδο ανοξείδωτο χάλυβα. Η μέθοδος αυτή δε δύναται να εφαρμοστεί σε ευρεία κλίμακα, παρά μόνο εργαστηριακά, παρότι εμφάνισε μείωση του COD κατά 93%, λόγω των ενεργειακών ποσοτήτων που απαιτούνται.

1.7.2. Αναερόβια ζύμωση των ΥΑΕ για παραγωγή βιοαερίου (βιομεθανοποίηση)

Η αναερόβια ζύμωση είναι μια μέθοδος επεξεργασίας αποβλήτων υψηλού ρυπαντικού φορτίου ($\text{COD } 5\text{-}40 \text{ g l}^{-1}$) με την οποία επιδιώκεται η αποδόμηση των αποβλήτων αυτών και παράλληλα η βιομετατροπή των οργανικών ουσιών τους σε μεθάνιο (Aggelis et al. 2001). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε μια πολύπλοκη βιοχημική διεργασία που πραγματοποιείται σε ειδικούς βιοαντιδραστήρες απουσία οξυγόνου κατά την οποία οι οργανικές ουσίες των αποβλήτων αποδομούνται και διασπώνται σε μικρότερα μόρια με τη συμβολή μεθανογόνων βακτηρίων. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η συνεχής έκλυση βιοαερίου (μίγμα μεθανίου 65% και διοξειδίου του άνθρακα 35%) το οποίο είναι ενεργειακά αξιοποιήσιμο και η παραγωγή επεξεργασμένης ιλύος (βιολογικής λάσπης), η οποία λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά μπορεί μετά από ειδική επεξεργασία να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα. Οι πρώτες έρευνες που έγιναν πάνω στην αναερόβια επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων ανέφεραν τη μείωση του οργανικού φορτίου (BOD_5) κατά 80% και παράλληλα την παραγωγή 0.85 m^3 βιοαερίου, περιεκτικότητας 80 και 20% σε CH_4 και CO_2 , αντίστοιχα ανά Kg αποβλήτου. Η ποσότητα του βιοαερίου που παράχθηκε αναφέρθηκε ότι δύναται να καλύπτει ενεργειακά της ανάγκες της μονάδας βιομεθανοποίησης. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στον Ελλαδικό χώρο είχαν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή βιοαερίου μέσω αναερόβιας ζύμωσης των ΥΑΕ με παράλληλη μείωση του οργανικού φορτίου. Συγκεκριμένα, ο Νταλής (1989) αναφέρει ότι τα αρχικά συνολικά απόβλητα τοποθετούνται απ' ευθείας σε βιοαντιδραστήρα αναρροής για να υποβληθούν σε αναερόβια ζύμωση, χωρίς να απαιτείται ρύθμιση του pH με ασβέστη και αφαίρεση του ελαιώδους στρώματος. Μετά από χρόνο παραμονής πέντε ημερών των ΥΑΕ στον βιοαντιδραστήρα διαπιστώθηκε αποδόμηση κατά 75-80% του αρχικού οργανικού ρυπαντικού φορτίου τους και παράλληλα παραγωγή 1280 m^3 βιοαερίου ή 895 m^3 μεθανίου ημερησίως. Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα οι Georgakakis and Dalis (1993) μελέτησαν στην περιοχή Πεζών Κρήτης την εφαρμογή ενός συστήματος αναερόβιας βιολογικής επεξεργασίας ΥΑΕ που στηριζόταν στην απόδοση δύο διαφορετικών τύπων χωνευτήρων με παράλληλη παραγωγή βιοαερίου. Η παραγόμενη ενέργεια ήταν $4,45 \text{ m}^3$ βιοαερίου ανά m^3 αποβλήτου, ποσότητα αρκετή για να χρησιμοποιηθεί για την κάλυψη αναγκών θέρμανσης 15 στρεμμάτων θερμοκηπίου. Οι μέθοδοι βιομεθανοποίησης όμως παρουσιάζουν και μειονεκτήματα όπως, τη χρησιμοποίηση εξοπλισμού και εγκαταστάσεων μεγάλου κόστους, την απαίτηση εξειδικευμένου προσωπικού, το μεγάλο χρόνο παραμονής των αποβλήτων στον αντιδραστήρα, την πρόκληση ανεπιθύμητων οσμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και τέλος τη διάθεση του υπολείμματος, το οποίο για να διατεθεί απευθείας στο περιβάλλον χρειάζεται περαιτέρω επεξεργασία (Borja et al. 1993, Georgakakis & Dalis 1993).

1.7.3. Συγκομποστοποίηση

Η μέθοδος της συγκομποστοποίησης στηρίζεται στη συνεχή ή διακοπτόμενη αναπλήρωση με απόβλητα των εξατμιζόμενων ποσοτήτων νερού, λόγω της θερμότητας η οποία εκλύεται κατά τη θερμοφιλή φάση της αερόβιας χώνευσης των στερεών οργανικών υλικών. Το ζυμούμενο στερεό υπόστρωμα εφοδιάζεται με οργανικό υλικό που διατηρεί τη μικροβιακή δράση και κατά συνέπεια και τη θερμοκρασία σε υψηλά επίπεδα, αφ' ετέρου δε επιταχύνεται η διαδικασία εξάτμισης του περιεχομένου στα απόβλητα νερού, λόγω επιμήκυνσης της θερμοφιλής φάσης και της θερμότητας που εκλύεται. Μετά την ολοκλήρωση της θερμοφιλής φάσης και της φάσης ωρίμανσης προκύπτει ένα ποιοτικά αξιόλογο οργανοχουμικό λίπασμα (Μπαλής κ.α., 1991). Το τελικό προϊόν εφαρμόστηκε σε διαφορετικές καλλιέργειες φυτών σε διάφορες αναλογίες με ικανοποιητικά αποτελέσματα και με δυνατότητα βελτίωσης του, όσον αφορά τον έλεγχο της ωριμότητας, το βαθμό σταθεροποίησης και τη φυτοτοξικότητά του πριν από οποιαδήποτε γεωργική χρήση. Η δυνατότητα εφαρμογής των κομπόστ αυτών στα εδάφη είναι πιο ασφαλής σε σχέση με τα κομπόστ που προέρχονται από αστικά απορρίμματα λόγω της απουσίας βαρέων μετάλλων, τοξικών συνθετικών οργανικών ενώσεων και τέλος την απουσία παθογόνων μικροοργανισμών ή ιών επικινδύνων για τον άνθρωπο και τα ζώα. Στην συγκομποστοποίηση με λιόζουμα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα γεωργικά στερεά υπολείμματα όπως είναι φύλλα και κλαδιά ελιάς, υπολείμματα βαμβακιού, άχυρα σιταριού, άχυρα καλαμποκιού, δασικά υπολείμματα και εκχυλισμένος ελαιοπυρήνας (πυρηνόξυλο) (Paredes et al. 1987, Ntougias et al. 2003, 2006a). Η χρήση του πυρηνόξυλου για τη διαχείριση των λιόζουμων μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία ώστε με την τεχνική της συγκομποστοποίησης πυρηνόξυλου με λιόζουμα, να παραχθεί ως τελικό προϊόν ένα μη φυτοτοξικό βελτιωτικό εδάφους με επισχετικές ιδιότητες στην ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων εδάφους (Καντρουλάκης et al. 2005, Ntougias et al. 2003, 2006a, Οιχαλιώτης και Ζερβάκης 1999, 2000). Το περιεχόμενο του συγκεκριμένου βελτιωτικού εδάφους αποτελείται από τα χουμικά συστατικά της κομποστοποίησης, ένα πλήθος μικροοργανισμών καθώς και τα λιπαρά στοιχεία των ΥΑΕ, που συμβάλλουν στην αύξηση της γονιμότητας του εδάφους (Balis et al. 1991). Άλλες μελέτες (Zervakis and Balis 1996b, Zervakis et al. 1996) έδειξαν ότι το εμπλουτισμένο με ελαιόζουμο πυρηνόξυλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την παραγωγή εδώδιμων μανιταριών *Pleurotus*, αναδεικνύοντας το σαν ένα εναλλακτικό μέσο καλλιέργειας τους. Μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι πως απαιτούνται σχετικά περιορισμένες ποσότητες ΥΑΕ για τη διαβροχή των υποστρωμάτων καλλιέργειας των μανιταριών και έτσι με αυτή τη διαδικασία δεν μπορεί να δοθεί λύση στο ζήτημα της διαχείρισης των τεράστιων όγκων αποβλήτων που παράγονται εντός 3-4 μηνών (Οιχαλιώτης και Ζερβάκης 1999, 2000).

1.7.4. Παραγωγή βιοαποδομήσιμων υλικών

Ο Saiz-Jimenez και οι συνεργάτες του (1986) χαρακτήρισαν μια σειρά από πολυμερείς ουσίες που βρέθηκαν σε μη κατεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων καθώς και στα υπολείμματα αυτών που μένουν μετά την εξάτμιση τους σε δεξαμενές. Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραγωγή πολύ-β-υδρόξυ βουτυρικού οξέος και πολυσακχαριτών που παράχθηκαν από την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών σε ΥΑΕ. Ο σχηματισμός του βιοπολυμερούς πόλυ-β-υδρόξυ βουτυρικού οξέος προήλθε από την ανάπτυξη του βακτηρίου *Azotobacter chroococcum* σε ΥΑΕ (Martinez-Toledo et al. 1995), ενώ το βακτήριο *Xanthomonas campestris* (Lopez-Lopez 1994), παρήγαγε, κατά την επώαση του σε ΥΑΕ, ξανθάνη, που χρησιμοποιείται σε βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων. Η παραγωγή βιοαποδομήσιμων πολυμερών από τη χρήση των ΥΑΕ χαρακτηρίζεται ως ενδιαφέρουσα μέθοδος, λόγω του χαμηλού κόστους απόκτησης τους.

1.7.5. Παραγωγή στερεών καυσίμων

Τα υγρά απόβλητα που υπόκεινται στην συγκεκριμένη επεξεργασία, παρουσιάζουν τη δυνατότητα της καλύτερης ζύμωσης αγροτικών ή δασικών υπολειμμάτων χαμηλής πυκνότητας, με απώτερο σκοπό την παραγωγή ενός προϊόντος ομοιογενών τεμαχίων σφαιρικής ή κυβικής μορφής. Ο Μιχελάκης και Κουτσαυτάκης (1989) αναφέρουν ότι σε μια περίπτωση εφαρμογής της μεθόδου στην Ισπανία, όπου σαν πρώτες ύλες χρησιμοποιήθηκαν ΥΑΕ (κατά 40%), δασική βιομάζα (κατά 40%) και στερεά αστικά υπολείμματα (κατά 20%), η ενεργειακή απόδοση ήταν της τάξεως των 4500 kcal kg⁻¹. Εντούτοις, περαιτέρω έρευνες δεν έχουν πραγματοποιηθεί.

1.7.6. Ελεγχόμενη εφαρμογή σε εδαφικούς αποδέκτες

Η άκριτη εισαγωγή των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων στο οικοσύστημα (κοντινούς χείμαρρους, ξερορέματα, θάλασσες ή λίμνες) προκαλεί επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Το μέγεθος της οικολογικής καταστροφής (υδάτινη πανίδα και χλωρίδα), που συντελείται διαφέρει ανάλογα με τον υδάτινο αποδέκτη και τη δυνατότητα αυτοκαθαρισμού του. Η ιδιάζουσα σύσταση (υψηλό φαινολικό και λιπαρό φορτίο) των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων ασκεί μια επιλεκτική δράση στους μικροοργανισμούς του εδάφους ευνοώντας την ανάπτυξη εκείνων των στελεχών που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα συστατικά του (Paredes et al. 1987, Piotrowska et al. 2006). Η διάθεση των ΥΑΕ στο έδαφος μπορεί να εφαρμοστεί υπό προϋποθέσεις, αφού στη σύστασή τους δεν περιέχονται ουσίες υψηλής επικινδυνότητας, όπως βαρέα μέταλλα (Andrich et al. 1992). Παράλληλα, η ευεργετική επίδραση τους στο έδαφος ενισχύεται από την παρουσία αξιοσημείωτων ποσοτήτων οργανικών ουσιών, φωσφόρου, καλίου και μαγνησίου αλλά και εξαιτίας

του εμπλουτισμού του εδάφους με συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, οι οποίοι βοηθούν την επίσχεση διαφόρων φυτοπαθογόνων μυκήτων (Ntougias et al. 2003). Ο Fiestas (1997) μετά από μια σειρά πειραμάτων απέδειξε την τοξική επίδραση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων σε διάφορα είδη κυπρίνων, ενώ ο Balice και οι συνεργάτες του (1984) αναφέρουν συστατικά των λιόζουμων τα οποία είναι τοξικά στα ψάρια και γενικότερα στη χλωρίδα και την πανίδα του νερού. Επίσης, η Βορεάδου (1994) αναφέρεται στην αρνητική επίδραση των λιόζουμων στη βιοποικιλότητα των τμημάτων της διαδρομής των χειμάρρων (που έχουν ρυπανθεί από τη διάθεση ελαιόζουμων) κατά 41.6 έως 71.4% (ανάλογα με την παροχή νερού του χειμάρρου). Η απευθείας εφαρμογή μεγάλων ποσοτήτων ΥΑΕ σε καλλιεργούμενο έδαφος και συγκεκριμένα σε ετήσιες καλλιέργειες και ποώδη φυτά αναστέλλει τη βλάστησή τους, δρώντας παρεμποδιστικά. Ο βαθμός τοξικότητας του εξαρτάται από το είδος της καλλιέργειας και το στάδιο ανάπτυξης των φυτών (Casa et al. 2003). Αντιθέτως, δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική φυτοτοξική δράση σε δένδρα που έγινε απευθείας εφαρμογή των υγρών αποβλήτων (μέθοδος της φερτάρδευσης) (Οιχαλιώτης και Ζερβάκης 2002, Ehaliotis et al. 2003). Έρευνες που έχουν γίνει στην Ιταλία και στην Ισπανία, δείχνουν ότι η άρδευση των ελαιοδένδρων με συγκεκριμένες ποσότητες ΥΑΕ όχι μόνο δεν επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη τους αλλά παρατηρείται και αύξηση των αποδόσεών τους. Επίσης δεν δημιουργεί αρνητικές επιπτώσεις στη μικροχλωρίδα και στη δομή του εδάφους, εφόσον οι χρησιμοποιούμενες δόσεις είναι ελεγχόμενες (Ζερβάκης 1999, Ehaliotis et al. 2003).

1.7.7. Βιολογική επεξεργασία: αποδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μικροοργανισμών

Πολλά πειράματα εστίασαν το ενδιαφέρον τους στην εξεύρεση μιας διαδικασίας βιοαποδόμησης των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων με τη χρήση μικροοργανισμών, στοχεύοντας στη μείωση του ρυπαντικού φορτίου τους και συνεπώς και στην αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων (Dias et al. 2004), οι οποίες παρουσιάζουν ισχυρή επισχετική δράση έναντι βακτηρίων και μυκήτων του εδάφους και στην παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας (Gonzales et al. 1990, Οιχαλιώτης και Ζερβάκης 1999, 2000). Οι μικροοργανισμοί αυτοί εισάγονται στα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων ως εμβόλια και για την επικράτηση τους πρέπει να εξασφαλιστούν ευνοϊκές συνθήκες όπως κατάλληλος αερισμός, θερμοκρασία και pH. Τα συστήματα βιολογικής επεξεργασίας χωρίζονται σε συστήματα αεροβικής ή αναεροβικής επεξεργασίας ανάλογα με το αν είναι στελέχη αερόβιων ή στελέχη αναερόβιων μικροοργανισμών.

Η κύρια ομάδα μικροοργανισμών η οποία χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για τη μείωση ή εξάλειψη της ρυπαντικής δράσης των φαινολικών ουσιών των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων είναι οι μύκητες, και συγκεκριμένα οι Βασιδιομύκητες λευκής σήψης για τους οποίους θα γίνει εκτενής ανάλυση στο επόμενο κεφάλαιο.

1.8. Αξιοποίηση ΥΑΕ στην παραγωγή ενζύμων

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου μπορούν να θεωρηθούν πηγή διάφορων ουσιών, όπως σάκχαρα, υπολείμματα λαδιού, πρωτεΐνες, μεταλλικά στοιχεία και φαινόλες, τα οποία μπορούν να ανακτηθούν με χημική εκχύλιση και μετέπειτα καθαρισμό ή να χρησιμοποιηθούν σε διεργασίες ζύμωσης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα υπολείμματα λαδιού που υπάρχουν στα ΥΑΕ, η ποσότητα των οποίων εξαρτάται από τη μέθοδο εξαγωγής του ελαιολάδου που ακολουθείται. Τα υπολείμματα αυτά καθιστούν το απόβλητο ένα δυνητικά κατάλληλο υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για λιπολυτικούς μικροοργανισμούς, καθώς προάγουν την παραγωγή του ενζύμου λιπάση. Στην πραγματικότητα, οι λιπολυτικοί μύκητες είναι μεταξύ των κύριων αποδομητών του κατσίγαρου κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του σε δεξαμενές και λιμνοθάλασσες (Brozzoli et al., 2009).

Οι λιπάσες (EC. 3.1.1.3), είναι ευρέως διαδεδομένα υδρολυτικά ένζυμα (υδρολάσες) που μπορούν να παραχθούν από ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς και έχουν σημαντικό εμπορικό ενδιαφέρον. Επειδή είναι οι πιο ευπροσάρμοστοι βιοκαταλύτες και επιφέρουν μια σειρά αντιδράσεων βιομετατροπής όπως η υδρόλυση, η εστεροποίηση, η αμινόλυση και άλλες, κατέχουν σήμερα σημαντικό ρόλο στην ταχεία ανάπτυξη της σύγχρονης βιοτεχνολογίας. Οι λιπάσες χρησιμοποιούνται ευρέως στην επεξεργασία λιπών και ελαίων, στην παρασκευή απορρυπαντικών και σκευασμάτων απολύμανσης, στην επεξεργασία τροφίμων, στην παρασκευή χαρτιού κ στην παραγωγή καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Οι περισσότερες από τις βιομηχανικά χρησιμοποιούμενες λιπάσες προέρχονται από βακτήρια και μύκητες (Sharma et al,2001).

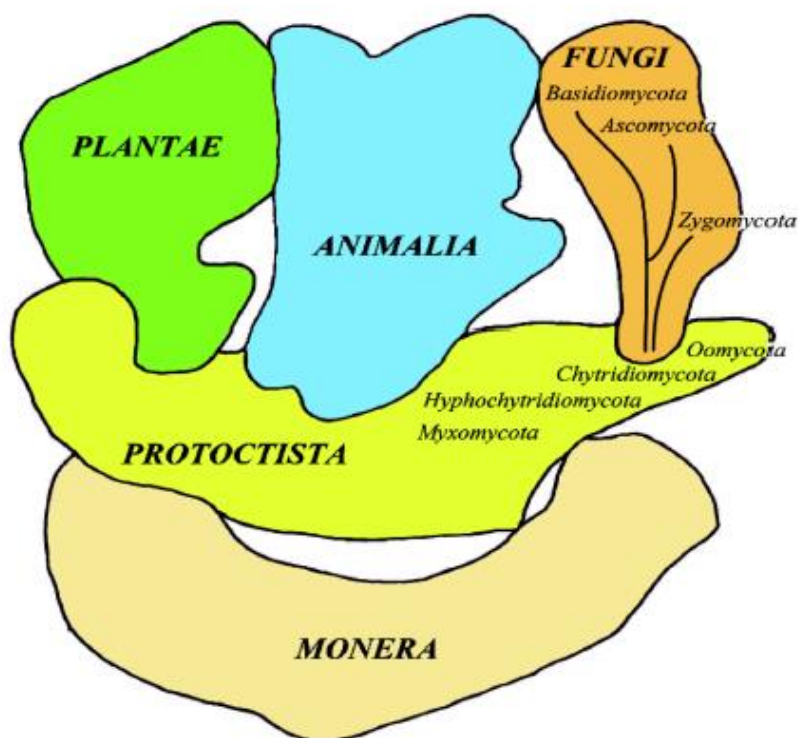
Τόσο το μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον όσο και ο αυξανόμενος αριθμός των εφαρμογών των λιπασών καθιστούν τη δυνατότητα παραγωγής του συγκεκριμένου ενζύμου από υγρά απόβλητα ελαιουργείου ιδιαίτερα σημαντική. Πολλοί μικροοργανισμοί, μεταξύ των οποίων οι *Candida cylindracea*, *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium citrinum* και άλλοι μύκητες έχουν παρουσιάσει πολύ καλή αποδοτικότητα στην παραγωγή λιπάσης από ΥΑΕ (Abrunhosa et al.,2013).

Κεφάλαιο 2.
Λιγνινολυτικοί Μύκητες

2.1. Εισαγωγή

Με τη λέξη μανιτάρια ονομάζονται οι μακροσκοπικές καρποφορίες εγγενούς αναπαραγωγής ορισμένων μυκήτων, στην πλειονότητα τους βασιδιομυκήτων και δευτερευόντως ασκομυκήτων. Οι μύκητες περιλαμβάνονται στους μικροοργανισμούς, δηλαδή στους οργανισμούς που έχουν διαστάσεις μικρότερες από τη διακριτική ικανότητα του γυμνού ανθρώπινου ματιού (0,1 mm). Οι μύκητες αυτοί οι οποίοι σε κάποια φάση του βιολογικού τους κύκλου σχηματίζουν καρποφορίες που, ανάλογα με το είδος, μπορεί να είναι από μερικά δέκατα του χιλιοστού έως και πάνω από μισό μέτρο χαρακτηρίζονται και μακρομύκητες. Ο όρος “μύκης” χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Θεόφραστο (3ος π.Χ. αιώνας) για να χαρακτηρίσει ακριβώς τα μανιτάρια. Η λέξη “μανιτάρι” είναι παραφθορά της λέξης “αμανίτης” που χαρακτηρίζει τα είδη του πολύ σημαντικού γένους *Amanita* και κατ’ επέκταση είδη με σαρκώδεις καρποφορίες.

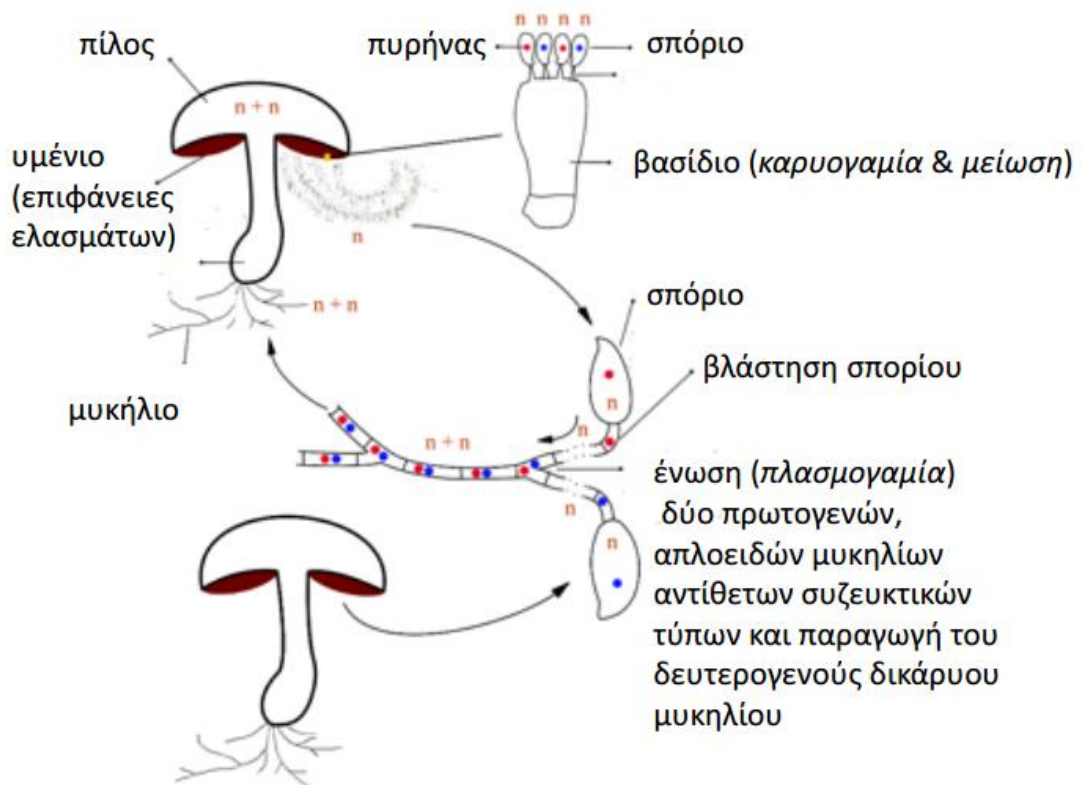
Οι μύκητες, σύμφωνα με το πλέον αποδεκτό σήμερα ταξινομικό σχήμα του Whittaker (1959), αποτελούν ένα από τα 5 βασίλεια στα οποία κατατάσσονται τα έμβια όντα με κυτταρική δομή και είναι το δεύτερο σε πλήθος ειδών άθροισμα (μετά τα έντομα) στον πλανήτη. Τα καταγραμμένα σήμερα είδη είναι περίπου 80.000-90.000 αλλά αυτό εκτιμάται ότι δεν αντιπροσωπεύει παρά το 5% περίπου των υπαρχόντων ειδών (κάθε χρόνο ανακαλύπτονται δεκάδες έως εκατοντάδες νέα είδη).



Εικόνα 2.1: Τα 5 βασίλεια του Whittaker (Margulis, 1981)

Οι μύκητες είναι οργανισμοί ετερότροφοι (δηλαδή χρειάζονται έτοιμες οργανικές ενώσεις για να τραφούν) και ευκαρυωτικοί (έχουν οργανωμένο πυρήνα που περικλείει τα χρωμοσώματά τους). Τα κύτταρά τους περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα (όπως και τα φυτικά κύτταρα) με κύριο συστατικό τη χιτίνη (ένα πολυμερές που συνθέτει και τον εξωσκελετό των εντόμων). Τέλος οι μύκητες, στη συντριπτική τους πλειονότητα, έχουν την ιδιότητα να αναπαράγονται και να πολλαπλασιάζονται με ειδικές αναπαραγωγικές μονάδες, τα σπόρια, τα οποία κατά κανόνα σχηματίζονται από εξειδικευμένα αναπαραγωγικά όργανα.

Ένας τυπικός μύκητας αποτελείται από μία μάζα διακλαδισμένων, κυλινδρικών νηματίων που ονομάζονται υφές. Το σύνολο των υφών είναι γνωστό ως μυκήλιο, το οποίο αποτελεί το αδιαφοροποίητο σώμα ή θαλλό του μύκητα. Οι υφές μπορεί να είναι συνεχείς ή κοινοκυτταρικές ή πολυκυτταρικές, όταν χωρίζονται σε περισσότερα από ένα κύτταρα με κάθετα τοιχώματα που ονομάζονται σέπτα. Στις κοινοκυτταρικές υφές οι πυρήνες είναι διάσπαρτοι στο κυτταρόπλασμα. Στις πολυκυτταρικές υφές, κάθε κύτταρο μπορεί να περιέχει έναν, δύο, ή πολλούς πυρήνες, ανάλογα με τον τύπο του μύκητα και το στάδιο ανάπτυξης της υφής (Δήμου, 2005).



Εικόνα 2.2: Ο βιολογικός κύκλος των βασιδιομυκήτων (Denchev et al., 2013)

Η συστηματική ταξινόμηση των μυκήτων ακολουθεί την εξής ταξινόμική βαθμίδα: Βασίλειο → Φύλο → Κλάση → Τάξη → Οικογένεια → Γένος → Είδος. Οι βασιδιομύκητες αποτελούν ένα φύλο του βασιλείου των μυκήτων, που περιλαμβάνει περίπου το 25% του συνόλου των μυκήτων.

Πίνακας 2.1: Ταξινόμηση μυκήτων (Madigan et al., 2000)

Ταξινόμική Ομάδα	Κοινή ονομασία	Αντιπροσωπευτικό γένος	Τύπος σπορίων	Περιβάλλον
Ασκομύκητες (Ascomycetes)	Μύκητες	<i>Neurospora</i> , <i>Sacharomyces</i> , <i>Morchella</i>	Ασκοσπόριο	Έδαφος, φυτικό υλικό σε αποσύνθεση
Βασιδιομύκητες (Basidiomycetes)	Μανιτάρια	<i>Amanita</i> , <i>Agaricus</i> , <i>Pleurotus</i>	Βασιδιοσπόριο	Έδαφος, φυτικό υλικό σε αποσύνθεση
Ζυγομύκητες (Zygomycetes)	Μούχλες ψωμιού	<i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> ,	Ζυγοςπόριο	Έδαφος, φυτικό υλικό σε αποσύνθεση
Ωομύκητες (Oomycetes)	Μούχλες νερού	<i>Allomyces</i>	Ωοσπόριο	Υδατικό μέσο
Δευτερομύκητες (Deuteromycetes)	Ατελείς Μύκητες	<i>Penicillium</i> , <i>Aspegillus</i> , <i>Candida</i>	Άγνωστα	Έδαφος, φυτικό υλικό σε αποσύνθεση, επιδερμίδα ζώων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα ΥΑΕ περιέχουν αρωματικές ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα των φαινολών. Οι ενώσεις αυτές ευθύνονται για την τοξικότητα των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και το ιδιαίτερο χρώμα τους. Ένα άλλο χαρακτηριστικό αυτών των ενώσεων είναι ότι έχουν δομικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά της λιγνίνης. Οι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αποδόμηση της λιγνίνης στη φύση είναι οι μυκηλιακοί μύκητες. Οι πιο αποδοτικοί αποδομητές της ομάδας των μυκηλιακών μυκήτων είναι οι βασιδιομύκητες (Kirk & Farrell, 1987). Υπάρχουν τρεις τύποι μυκήτων που ζουν πάνω σε οργανική ύλη (ξύλο) που αποσυντίθεται και αποδομούν ένα ή περισσότερα συστατικά της: οι μύκητες ελαφριάς σήψης (soft rot fungi), οι μύκητες καστανόχρωμης σήψης (brown rot fungi) και οι μύκητες λευκής σήψης (white rot fungi).

2.1.1. Μύκητες λευκής σήψης

Οι μύκητες λευκής σήψης είναι νηματοειδείς μύκητες οι οποίοι ζουν και αναπτύσσονται πάνω σε οργανική ύλη (ξύλο κ.α.) που βρίσκεται σε κατάσταση αποσύνθεσης. Ανήκουν στους ανώτερους μύκητες και συγκεκριμένα στην κατηγορία των βασιδιομυκήτων. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτών των μυκήτων είναι η ικανότητά τους να αποδομούν τη λιγνίνη, τη δεύτερη πιο άφθονη οργανική ουσία πάνω στη γη μετά την κυτταρίνη (Hatakka 2001; Hofrichter, 2002; Kirk & Farrell, 1987). Η αποδόμηση της λιγνίνης ξεκινάει στο τέλος της πρωτογενούς ανάπτυξης κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό ελλείπει θρεπτικών συστατικών όπως το άζωτο, το θείο ή ο άνθρακας. Ονομάζονται μύκητες λευκής σήψης, λόγω του λευκού και ινώδους υπολείμματος που απομένει πάνω στην αποσυνθεμένη οργανική ύλη μετά τη δράση τους. Το ιδιαίτερο λιγνινολυτικό σύστημα των μυκήτων λευκής σήψης μπορεί να εφαρμοστεί σε μια μεγάλη ποικιλία επίμονων και τοξικών ενώσεων. Η μυκητιακή προσβολή είναι μια οξειδωτική και μη εξειδικευμένη διεργασία, κατά την οποία διασπώνται αρωματικοί δακτύλιοι, δημιουργούνται νέες καρβονυλικές ομάδες και ελαττώνεται το ποσοστό των μεθοξυ, φαινολικών και αλειφατικών ομάδων της λιγνίνης. Οι αλλαγές στο μόριο της λιγνίνης οδηγούν στον αποπολυμερισμό και την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (Kirk & Farrell, 1987; Hatakka, 2001).

Οι μύκητες λευκής σήψης αποδομούν τη λιγνίνη επιλεκτικά ή μη επιλεκτικά. Στην επιλεκτική αποσύνθεση (π.χ. *Ceriporiopsis subvermispora*, *Dichomitus squalens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*), η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη αποδομούνται περισσότερο από την κυτταρίνη, ενώ στη μη-επιλεκτική αποσύνθεση (π.χ. *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius*), αποδομούνται σε ίσες ποσότητες όλα τα συστατικά της λιγνινοκυτταρίνης (Blanchette, 1995; Hatakka 2001; Rayner & Boddy, 1988). Η επιλεκτική αποσύνθεση της λιγνίνης πραγματοποιείται στην αρχή της αποσύνθεσης και ακολουθεί η αποδόμηση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης (Dix & Webster, 1995). Ορισμένοι μύκητες όπως οι *Ganoderma applanatum*, *Heterobasidion annosum* και *Phellinus pini*, είναι ικανοί να πραγματοποιήσουν και τους δύο τύπους αποσύνθεσης (Blanchette, 1995; Rayner & Boddy, 1988). Οι θρεπτικοί παράγοντες ελέγχουν το είδος της προσβολής (Eaton & Hale, 1993; Rayner & Boddy, 1988). Η πλειοψηφία των μυκήτων λευκής σήψης αναπτύσσεται στα σκληρόξυλα δέντρα, αλλά συγκεκριμένα είδη όπως τα *Heterobasidion annosum*, *Phellinus pini* και *Phlebia radiata* αναπτύσσονται σε μαλακό ξύλο (Blanchette, 1995). Οι μύκητες λευκής σήψης παράγουν διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποδόμηση της λιγνίνης αλλά εκκρίνουν και κυτταρινάσες, ξυλανάσες και άλλες ημικυτταρινάσες. Οι περισσότεροι μύκητες εκκρίνουν υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP) και λακκάσες (Lac), αλλά μερικοί παράγουν και υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP) (Hatakka, 1994; 2001).

2.1.2. Μύκητες καστανόχρωμης σήψης

Οι μύκητες καστανόχρωμης σήψης αποτελούν μια σχετικά μικρή ομάδα βασιδιομυκήτων, οι οποίοι αποσυνθέτουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη του ξύλου παρακάμπτοντας τη λιγνίνη (Blanchette, 1995; Eriksson et al., 1990). Η παρουσία της λιγνίνης επάγει την αποσύνθεση της κυτταρίνης από τους μύκητες καστανόχρωμης σήψης, αν και η λιγνίνη αποδομείται σε μικρότερο ποσοστό κυρίως με απομεθυλίωση και μερικώς με αποδόμηση των εμπλουτισμένων σε λιγνίνη μεμβρανών μεγάλου πάχους (Blanchette, 1995; Hatakka, 2001). Ο μύκητας *Polyporus ostreiformis* έχει βρεθεί ότι παράγει MnP και LiP, ανάλογη των μυκήτων λευκής σήψης, αλλά η δυνατότητα αποδόμησης της λιγνίνης είναι αισθητά μικρότερη από αυτή του μύκητα λευκής σήψης *Phanerochaete chrysosporium* (Dey et al., 1994). Στο ξύλο που αποσυντίθεται παραμένει τροποποιημένη η λιγνίνη. Το καφέ υπόλειμμα παραμένει στα δάση για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς παραπέρα αποδόμηση, παρόλο που η τροποποιημένη λιγνίνη είναι πιο δραστική από τη φυσική λιγνίνη (Blanchette, 1995; Hatakka 2001; Kirk & Farrell, 1987). Οι μύκητες καστανόχρωμης σήψης αναπτύσσονται κυρίως σε δέντρα με μαλακό ξύλο παρά σε εκείνα με σκληρό ξύλο. Ακόμα, η ανάπτυξή τους ευνοείται κυρίως στο επάνω στρώμα εδάφους των κωνοφόρων δασών (Blanchette, 1995; Rayner & Boddy, 1988). Οι πιο μελετημένοι μύκητες αυτής της ομάδας είναι οι *Serpula lacrymans* και *Gloeophyllum trabeum* που αποσυνθέτουν ξύλινες κατασκευές και κτίρια (Blanchette, 1995; Eaton & Hale, 1993).

2.1.3. Μύκητες ελαφράς σήψης

Οι μύκητες ελαφράς σήψης ανήκουν κατά κύριο λόγο στους ασκομύκητες και τους δευτερομύκητες. Αναπτύσσονται σε δριμύ περιβάλλον, όπου η ανάπτυξη είναι δύσκολη για βασιδιομυκήτες-αποδομητές ξύλου, όπως υπερβολικά υγρό ή ξηρό κλίμα, καθώς και σε υποστρώματα πλούσια σε ιόντα μετάλλων ή συντηρητικά ξύλου. Οι μύκητες ελαφράς σήψης αντέχουν σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, pH και περιορισμό οξυγόνου από τους μύκητες λευκής και καστανόχρωμης σήψης (Blanchette, 1995; Blanchette et al., 1991; Daniel & Nilsson, 1998). Αναπτύσσονται στο χώμα, τα πριονίδια, το άχυρο και το προϊόν κομποστοποίησης, ενώ κάποια είδη έχουν βρεθεί σε θαλάσσια και γλυκά ύδατα. Η προσθήκη αζώτου αυξάνει το ρυθμό προσβολής σε αντίθεση με τις δύο άλλες ομάδες λιγνινολυτικών μυκήτων. Ειδικότερα σε καλλιεργήσιμα εδάφη και σε προϊόν κομποστοποίησης, οι μικρομύκητες (micromycetes) είναι οι πιο σημαντικοί αποδομητές της λιγνίνης. Τυπικοί κυτταρινολυτικοί μικρομύκητες του εδάφους είναι τα γένη *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Penicillium* και *Trichoderma* (Daniel & Nilsson, 1998; Eaton & Hale, 1993). Οι περισσότεροι κυτταρινολυτικοί μύκητες αποδομούν τη λιγνίνη του ξύλου σε περιορισμένη έκταση, ωστόσο λίγες πληροφορίες υπάρχουν για την ικανότητα αποδόμησης της λιγνίνης από τους μικρομύκητες. Αποσυνθέτουν όλα τα συστατικά του ξύλου, αλλά η απομάκρυνση της λιγνίνης είναι αργή και μερική, με

απομεθυλίωση (Eaton & Hale, 1993; Rayner & Boddy, 1988). Για τον ενζυμικό μηχανισμό των μυκήτων ελαφράς σήψης υπάρχουν λίγα δεδομένα.

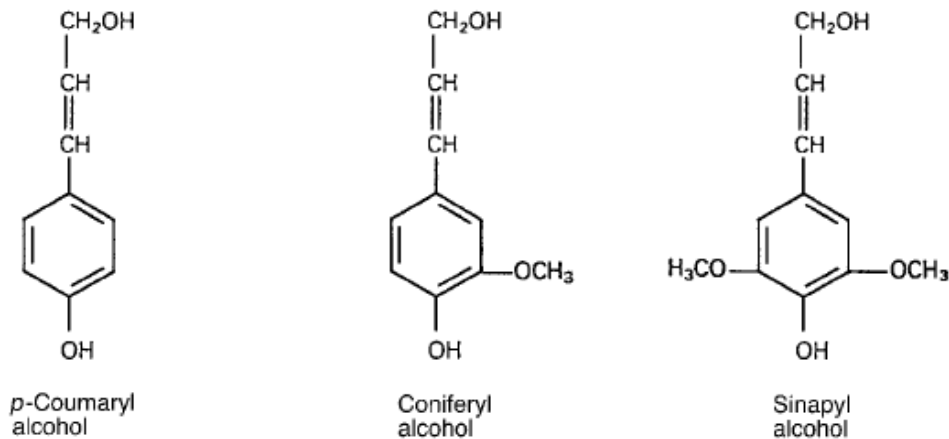
2.2. Λιγνινοκυτταρίνη

Η λιγνινοκυτταρίνη είναι, περίπου, η μισή από τη συνολική ποσότητα ύλης που παράγεται από τη φωτοσύνθεση. Αποτελείται από τρία είδη πολυμερών: την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη. Το ποσοστό του κάθε πολυμερούς ποικίλει μεταξύ των διάφορων φυτών. Κατά μέσο όρο, η λιγνινοκυτταρίνη αποτελείται από 45% κυτταρίνη, 30% ημικυτταρίνες και 25% λιγνίνη.

Η κυτταρίνη είναι το απλούστερο από τα συστατικά που βρίσκονται σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Είναι η πιο διαδεδομένη οργανική ένωση στη φύση. Η κυτταρίνη είναι πολυμερές αποτελούμενο από μονάδες γλυκόζης ενωμένες μεταξύ τους με (1,4)-β-D- γλυκοζιτικούς δεσμούς. Κατά την υδρολυτική της διάσπαση σχηματίζεται ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη. Οι μηχανικές της ιδιότητες οφείλονται στην παράλληλη διάταξη των επιμηκών μορίων της σε ίνες. Η χημική δομή της κυτταρίνης αποσαφηνίστηκε με έρευνες με ακτίνες X. Η κυτταρίνη διακρίνεται σε: α) ινώδη που προκύπτει από παράλληλο προσανατολισμό επιμηκών μορίων και αποτελεί το άκαμπτο μέρος των φυτικών ιστών και β) άμορφη κυτταρίνη που αποτελείται από αποδιοργανωμένα τμήματα και αποτελεί το εύκαμπτο μέρος των φυτικών ιστών.

Οι ημικυτταρίνες είναι μικρές αλυσίδες ετερογενών πολυμερών, οι οποίες περιέχουν εξόζες (σάκχαρα με έξι άτομα άνθρακα όπως γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη) και πεντόζες (σάκχαρα με πέντε άτομα άνθρακα όπως ξυλόζη και αραβινόζη). Οι τρεις κύριοι τύποι των ημικυτταρινών είναι α) ξυλάνες, οι οποίες έχουν σκελετό από πολύ-β-1,4-ξυλάνη με πλευρικές συνδέσεις σε αραβινόζη, β) γλυκουρονικό οξύ και αραβινογλυκουρονικό οξύ και γ) μαννάνες, οι οποίες αποτελούνται από γλυκομαννάνες, γαλακτομαννάνες και αραβινογαλακτάνες. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη που είναι κρυσταλλική, η ημικυτταρίνη είναι άμορφη και υδρολύεται ευκολότερα.

Η λιγνίνη είναι η δεύτερη σε αφθονία οργανική ένωση μετά την κυτταρίνη στη φύση. Είναι ένα τρισδιάστατο, σφαιρικό, ακανόνιστο, αδιάλυτο, υψηλού μοριακού βάρους (>10000) πολυμερές, αποτελούμενο από υπομονάδες φαινυλοπροπανίου, χωρίς αλυσίδες κανονικά επαναλαμβανόμενων μονάδων, ή κάποιους δεσμούς που μπορούν να υδρολύονται εύκολα, είτε χημικά, είτε ενζυμικά. Οι βασικές πρόδρομες μονομερείς μονάδες της λιγνίνης έχουν κοινή τη δομή τύπου φαινυλοπροπανίου και διαφέρουν ως προς τον αριθμό των μεθοξυλομάδων του αρωματικού δακτυλίου (Εικόνα 2.3). Στα φυτά η λιγνίνη συνδέεται με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη σχηματίζοντας μία φυσική ασπίδα για το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Η λιγνίνη είναι υπεύθυνη για την ακαμψία των φυτών και την ανθεκτικότητά τους σε μηχανικές πιέσεις και μικροβιακές επιθέσεις (Ταούκης κ.α., 2009).



Εικόνα 2.3: Οι τρεις πρόδρομες ενώσεις που συνθέτουν το μόριο της λιγνίνης (Gadd, 2001))

Η ακριβής δομή της λιγνίνης δεν είναι γνωστή, διότι είναι δύσκολο να εκχυλιστεί η λιγνίνη από τα φυτά. Η δυσκολία έγκειται στο γεγονός ότι η λιγνίνη είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την κυτταρίνη και άλλους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος. Οι βασικές μονάδες (η κονυφερυλική, η συναυλική και η π-κουμαρυλική αλκοόλη) συνδέονται μεταξύ τους με σταθερούς ανθρακικούς και αιθερικούς δεσμούς, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς (μεταξύ δύο βενζολικών δακτυλίων, δύο πλάγιων προπανοϊκών αλυσίδων, πλάγιας αλυσίδας και δακτυλίου, κ.λ.π.), δημιουργώντας έτσι το ιδιαίτερα πολύπλοκο και πολύ σταθερό μόριο της λιγνίνης. Η λιγνίνη είναι ιδιαίτερα ανθεκτική και δημιουργεί ένα εμπόδιο στη μικροβιακή προσβολή και την αποδόμηση του ξύλου. Γενικά, μόνο οι μύκητες λευκής σήψης θεωρούνται αρκετά αποτελεσματικοί στην αποδόμηση της λιγνίνης (Kirk & Farrell, 1987).

2.3. Λιγνινολυτικά ένζυμα

Οι μικροοργανισμοί που είναι κυρίαρχα υπεύθυνοι για την αποδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης είναι οι μύκητες και οι πιο ισχυροί αποικοδομητές αυτής της κατηγορίας είναι οι βασιδιομύκητες. Οι μύκητες έχουν δύο είδη εξωκυτταρικών ενζυμικών συστημάτων: α) ένα υδρολυτικό σύστημα, που παράγει υδρολάσες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποδόμηση των πολυσακχαριτών και β) ένα οξειδωτικό σύστημα, που αποδομεί τη λιγνίνη και διανοίγει τους φαινολικούς δακτυλίους (Sánchez, 2009).

Οι μύκητες λευκής σήψης αποδομούν τη λιγνίνη εκκρίνοντας ένζυμα, τα οποία συνολικά αναφέρονται ως «λιγνινάσες». Οι λιγνινάσες μπορούν να χωριστούν σε α) φαινολικές οξειδάσες, στις οποίες ανήκει η λακκάση (Lac) και β) υπεροξειδάσες, στις οποίες ανήκουν η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP). Σπάνια συναντιούνται και τα τρία αυτά ένζυμα σε έναν μικροοργανισμό, δηλαδή ο κάθε μικροοργανισμός μπορεί να παράγει διαφορετικό συνδυασμό λιγνινολυτικών ενζύμων όπως, Lac-MnP, Lac-LiP ή MnP-LiP (Hattaka, 1994). Στη συνέχεια θα αναλυθούν λεπτομερώς τα ένζυμα αυτά καθώς και ο μηχανισμός δράσης τους.

Συγκεντρωτικά τα εξωκυτταρικά λιγνινολυτικά ένζυμα που παίζουν ρόλο στην αποδόμηση της λιγνίνης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.2: Εξωκυτταρικά λιγνινολυτικά ένζυμα που συμμετέχουν στην αποδόμηση της λιγνίνης (Hattaka, 2001).

Ένζυμο	Συνένζυμο	Υπόστρωμα	Επίδραση ή αντίδραση
Υπεροξειδάση της λιγνίνης, LiP	H ₂ O ₂	Βερατρυλική αλκοόλη	Αρωματικός δακτύλιος οξειδώνεται στην αντίστοιχη κατιοντική ρίζα
Υπεροξειδάση του μαγγανίου, MnP	H ₂ O ₂	Mn ⁺² , οργανικά οξέα, θειόλες, ακόρεστα λιπίδια	Mn ⁺² οξειδώνεται σε Mn ⁺³ , οξείδωση των φαινολικών ενώσεων σε φαινοξυλικές ρίζες
Ευέλικτη υπεροξειδάση, (Versatile peroxidase, VP)	H ₂ O ₂	Παρόμοιες ενώσεις με την LiP και MnP	Ίδια επίδραση με την LiP και MnP
Λακκάση, Lac	O ₂	Φαινόλες, διαβιβαστές (mediators) π.χ. υδροξυβενζοτριαζόλη, ABTS	Φαινόλες οξειδώνονται σε φαινοξυλικές ρίζες
Οξειδάση της γλυοξάλης, GLOX	O ₂	Γλυοξάλη, μεθυλική γλυοξάλη	Γλυοξάλη οξειδώνεται σε γλυοξυλικό οξύ, παραγωγή H ₂ O ₂
Οξειδάση της αρυλικής αλκοόλης, AAO	O ₂	Αρωματικές αλκοόλες (ανισυλική, βερατρυλική αλκοόλη)	O ₂ ανάγεται σε H ₂ O ₂
Αφυδρογονάση της κελλοβιόξης (Cellobiose: quinone 1-oxidoreductase, CBQ)		Κελλοβιόξη	Αναγωγή των ο- και p-κινονών

2.3.1. Λακκάση

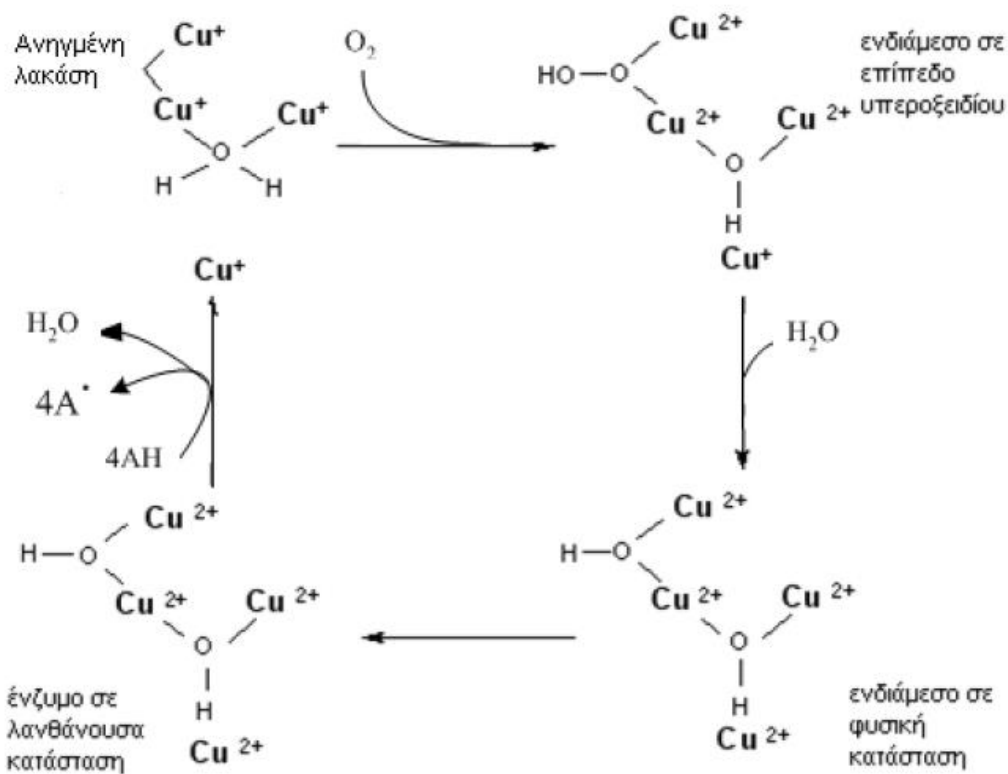
Η λακκάση, Lac, (EC 1.10.3.2) είναι μία πολυφαινολική οξειδάση και συγκεκριμένα είναι μέλος μιας ομάδας ενζύμων γνωστών ως μπλε οξειδασών που περιέχουν χαλκό στο ενεργό κέντρο τους. Τα ένζυμα αυτά είναι γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες καταλύουν την οξείδωση ενός ηλεκτρονίου διαφόρων υποστρωμάτων που συνοδεύεται από μια αναγωγή τεσσάρων ηλεκτρονίων του οξυγόνου σε νερό. Οι λακκάσες είναι μονομερείς πρωτεΐνες με τέσσερα άτομα χαλκού και έχουν μοριακά βάρη ανάμεσα σε 50 και 300 kDa και όξινά ισοηλεκτρικά σημεία (Mester & Tien, 2000). Το ένζυμο βρίσκεται σε μεγάλη ποικιλία φυτών και μυκήτων.

Τα ένζυμα περιέχουν διάφορους τύπους κέντρων χαλκού, τα οποία διακρίνονται από τις φασματοσκοπικές ιδιότητες (Kaim & Rall, 1996). Το κέντρο Cu “τύπου 1” είναι μονοπυρηνικό (1 άτομο Cu) και χαρακτηρίζεται από μια υψηλή απορρόφηση στο ορατό φάσμα ($\lambda_{max} \sim 600\text{nm}$). Αυτό το χαρακτηριστικό προσδίδει ένα ευδιάκριτο μπλε χρώμα στα ένζυμα που περιέχουν κέντρα χαλκού “τύπου 1”. Αυτά τα κέντρα Cu λειτουργούν αρχικά στη μεταφορά ηλεκτρονίων παρά στην κατάλυση, τα οποία διαφοροποιούνται από τα μονοπυρηνικά κέντρα Cu “τύπου 2”. Τα κέντρα Cu “τύπου 3” αποτελούνται από δύο στενά οριοθετημένα άτομα Cu και χρησιμοποιούνται στην κατάλυση, ειδικότερα στη δέσμευση και ενεργοποίηση του O_2 . Η λακκάση περιέχει 4 στενά συνδεδεμένα άτομα Cu, ένα από τα οποία δρα ως “τύπου 1”, το άλλο ως “τύπου 2” και τα άλλα δύο υπεισέρχονται στο κέντρο Cu “τύπου 3”. Το κέντρο “τύπου 1” βρίσκεται περίπου 13 Å σε απόσταση από τα τρία άτομα Cu, τα οποία είναι στενά συνδεδεμένα σε μια καταλυτική τριάδα και απέχουν περίπου ίση απόσταση μεταξύ τους (3.4-5.1 Å) (Kaim & and Rall, 1996). Μια κυστεΐνη, η οποία δεν εμπεριέχεται στη δισουλφιδική γέφυρα, θεωρείται ότι μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ του κέντρου “τύπου 1” και στην καταλυτική τριάδα (Briving et al., 1980). Ο καταλυτικός κύκλος της λακκάσης αποτελείται από μια ελεγχόμενη ροή ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα στην καταλυτική τριάδα (και ακολούθως στο οξυγόνο) μέσω του κέντρου “τύπου 1”.

Η λακκάση καταλύει την οξείδωση ενός ηλεκτρονίου ενός υποστρώματος, παράλληλα με την αναγωγή τεσσάρων ηλεκτρονίων από το οξυγόνο στο νερό (τα ηλεκτρόνια αποθηκεύονται από συνεχείς οξειδώσεις πριν την απελευθέρωση τους για τον σχηματισμό των 2 H_2O από 1 O_2 (Εικόνα 2.4). Η απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου καταλύεται από τη λακκάση και οδηγεί στο σχηματισμό μιας ελεύθερης οργανικής ρίζας. Αυτός ο τύπος είναι γενικά ασταθής και υπόκεινται σε περαιτέρω αντιδράσεις, είτε αυθόρμητες (για παράδειγμα πολυμερισμός ή διάσπαση) ή ενζυμικά καταλυόμενες (αναγωγή ή οξείδωση σε κινόνη). Παρόλο που η λακκάση κατηγοριοποιείται ως μια διφαινολική οξειδάση, η ποικιλία υποστρωμάτων *in vitro* είναι μεγάλη, περιλαμβάνοντας τις μονολιγνόλες και τις διαμίνες (Thurston, 1994).

Όπως συμβαίνει με την LiP και MnP, η λακκάση δρα μέσω των οξειδοαναγωγικών μεσολαβητών ή ενδιάμεσων προϊόντων στα υποστρώματα, τα οποία δεν είναι προσβάσιμα υπό κανονικές συνθήκες ή δεν μπορούν να οξειδωθούν

από το ένζυμο. Για παράδειγμα, πολλά μη φαινολικά σώματα ανάλογα της λιγνίνης με υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό οξειδώνονται και αποδομούνται από τη λακκάση παρουσία του διαμεσολαβητή 2,2-azinobis-(3-ethylbenzthiazolate-6-sulfonate) ή συντομογραφικά ABTS (Bourbonnais & Paice, 1990). Αυτή η ανακάλυψη ήταν σημαντική για την *in vitro* αποδόμηση της λιγνίνης με το συνδυασμό λακκάσης /ABTS και υπέδειξε ότι το ένζυμο παίζει ρόλο στα μυκητιακά συστήματα παρουσία ενός φυσιολογικού ισοδύναμου του ABTS.



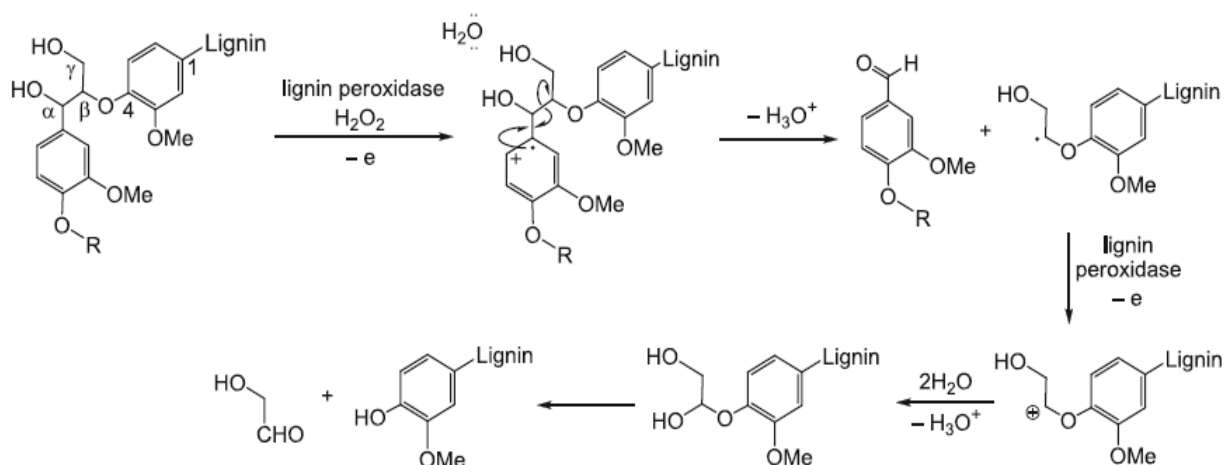
Εικόνα 2.4: Ο καταλυτικός κύκλος της λακκάσης (Wesenberg et al., 2003)

Τόσο η λακκάση όσο και οι δύο λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες εκφράζονται ως πολλαπλά ισοένζυμα. Αρχικά, τα πολλαπλά ισοένζυμα λακκάσης θεωρούνταν ως τροποποιήσεις του ίδιου γονιδιακού προϊόντος, αφού αυτό είχε περάσει το στάδιο της μετάφρασης, αλλά αρκετές ερευνητικές ομάδες κατάφεραν να απομονώσουν και να χαρακτηρίσουν αρκετά γονίδια και αντίγραφα cDNA λακκασών. Παραδείγματα αποτελούν οι τέσσερις ακολουθίες cDNA λακκάσης του μύκητα *Rhizoctonia solani*, τα πέντε γονίδια λακκάσης του *Trametes villosa*. Τα παραδείγματα αυτά καταδεικνύουν, ότι μέρος της βιοχημικής ποικιλίας των ισοενζύμων της λακκάσης, πρέπει να οφείλεται στη γονιδιακή πολλαπλότητα των αντίστοιχων γονιδίων της λακκάσης (Mansur et.al., 1998).

2.3.2. Υπεροξειδάση της λιγνίνης

Η υπεροξειδάση της λιγνίνης, LiP, (EC.1.11.1.14) είναι μια εξωκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 40 kDa. Το ένζυμο διαθέτει μια πρωτοπορφυρίνη IX ανά μόριο και έχει βέλτιστο pH περίπου 3.0 (Kirk & Farrell, 1987). Αρχικά, η LiP περιγράφηκε στο μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* (Gold et al., 1984; Tien & Kirk, 1983) και είναι χαρακτηριστική ανάμεσα στους μύκητες λευκής σήψης, ενώ έχει απομονωθεί και από καλλιέργειες μυκήτων καστανόχρωμης σήψης (Dey et al., 1991).

Η σπουδαιότητα της LiP στην αποδόμηση της λιγνίνης τεκμηριώνεται από τις εξής καταλυόμενες αντιδράσεις: διάσπαση του δεσμού Cα-Cβ σε β-O-4 αρυλ-αιθερικές ενώσεις, οξείδωση του Cα των παραπάνω ενώσεων στις αντίστοιχες κετόνες, οξειδωτική σχάση του αρωματικού δακτυλίου μεταξύ C₃-C₄, απομεθυλίωση και υδροξυλίωση των βενζυλικών μεθυλενομάδων (Εικόνα 2.5). Ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων αποτελεί υπόστρωμα για την οξείδωση που καταλύεται από την LiP, περιλαμβάνοντας μια πληθώρα μη φαινολικών υποστρωμάτων. Η LiP οξειδώνει τη βερατρυλική αλκοόλη (3,4 διμέθοξυ-βενζυλική αλκοόλη), ένα φυσικό δευτεροταγές μη φαινολικό αρωματικό μεταβολίτη του μύκητα *P.chrysosporium*. Η οξείδωση του μορίου αυτού εξυπηρετεί ως μια κλασσική μέθοδος για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας (Buswell, 1991).



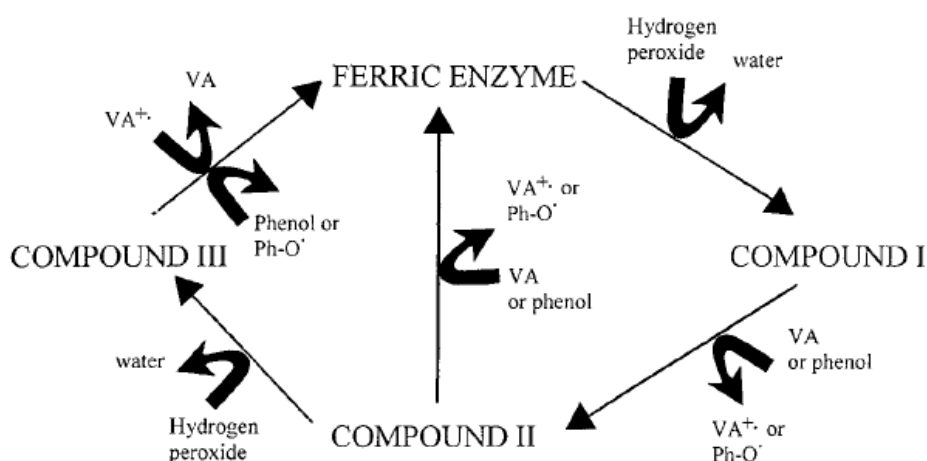
Εικόνα 2.5: Καταλυόμενες αντιδράσεις από την υπεροξειδάση της λιγνίνης

(Chen et al., 2012)

Ο καταλυτικός κύκλος της LiP ξεκινάει με το ένζυμο στη μορφή τρισθενούς σιδήρου – LiP, το οποίο υποβάλλεται σε μια οξείδωση δύο ηλεκτρονίων και παράγεται η Ένωση I, μια οξυσιδηρούχος ένωση που περιέχει το Fe⁴⁺ και επακολουθεί η αναγωγή του H₂O₂ σε H₂O (Εικόνα 2.6). Η ένωση I πραγματοποιεί μια οξείδωση ενός ηλεκτρονίου κάποιου υποστρώματος (ένα μονομερές της λιγνίνης ή βερατρυλική αλκοόλη) παράγοντας την Ένωση II. Το ένζυμο επιστρέφει στην αρχική του μορφή, με αναγωγή δύο ηλεκτρονίων μέσω της δραστικής μορφής του, της

Ένωσης II. Οι αρυλοκατιοντικές ρίζες των μονομερών της λιγνίνης υπόκεινται σε μια σειρά μη ενζυματικών αντιδράσεων, δημιουργώντας μια ποικιλία προϊόντων (Kirk & Farrell, 1987). Η Ένωση III παράγεται όταν υπάρχει περίσσεια H_2O_2 και οδηγεί στην απενεργοποίηση του ενζύμου. Η βερατρυλική αλκοόλη προστατεύει την LiP από την απενεργοποίηση του υπεροξειδίου και το ένζυμο επιστρέφει στην αρχική μορφή του (Kirk & Farrell, 1987; Wariishi & Gold, 1990). Άλλες ομάδες έχουν προσδιορίσει διαφορετικό ρόλο για τη βερατρυλική αλκοόλη, δηλαδή το ρόλο του οξειδοαναγωγικού μεσολαβητή. Θεωρείται ότι στο πρώτο στάδιο σχηματίζεται η ένωση I από τις κατιοντικές ρίζες της βερατρυλικής αλκοόλης, οι οποίες διαχέονται μακριά από το ένζυμο και οξειδώνουν μη φαινολικές υπομονάδες της λιγνίνης. Οι οξειδωμένες υπομονάδες υπόκεινται σε αυθόρμητες αντιδράσεις, εξηγώντας την παρουσία πολλαπλών προϊόντων. Επιπροσθέτως, οι Popp et al. (1990) πρότειναν ένα μηχανισμό, κατά τον οποίο οι ρίζες της βερατρυλικής αλκοόλης που σχηματίζονται από την οξείδωση της LiP αντιδρούν με τα οξαλικά ιόντα και τελικά παράγεται το Mn^{3+} , ένα ισχυρό οξειδωτικό που δύναται να αρχίσει τις αντιδράσεις διάσπασης της λιγνίνης. Με την παραπάνω ερμηνεία, εξηγείται ο αποπολυμερισμός ενός μορίου, το οποίο είναι πολύ στενά πακεταρισμένο στο χώρο για να επιτρέψει τη διείσδυση ενός ενζύμου (Jurasek, 1995).

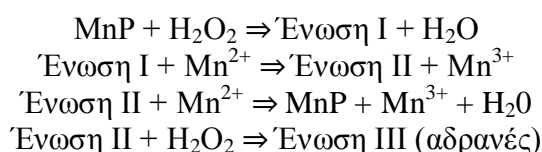
Η LiP εκφράζεται από τους μύκητες λευκής σήψης ως μια σειρά ισοενζύμων. Οι Odier και Delattre (1990) απομόνωσαν 9 διαφορετικά ισοένζυμα της LiP από τον μύκητα *P. chrysosporium*. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν μικρές διαφορές στις κινητικές παραμέτρους, αλλά η μεταξύ τους ομολογία είναι μεγάλη, όπως αποδεικνύεται από αντιδράσεις αντισωμάτων και αλληλουχίες των αμινο-τελικών άκρων. Άλλες μελέτες έχουν ανακαλύψει ακόμα περισσότερα ισοένζυμα της LiP, που διαφέρουν ελάχιστα στο pI (ισοηλεκτρικό σημείο), ειδική ενεργότητα, Km (σταθερά Michaelis- Menten) για διάφορα υποστρώματα (Barclay, 1990; Kirk et al., 1986).



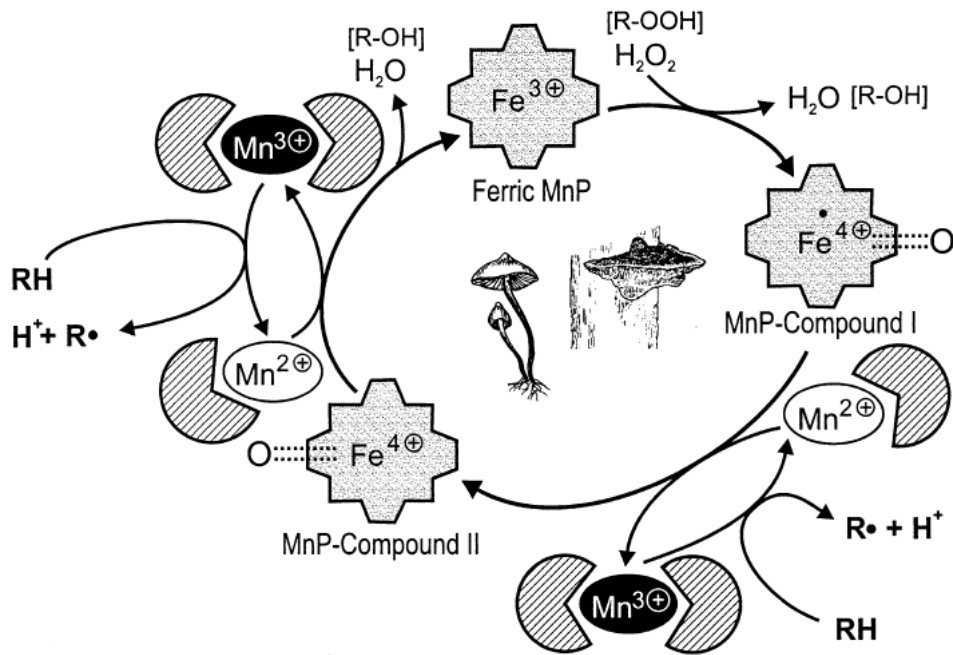
Εικόνα 2.6: Ο καταλυτικός κύκλος της υπεροξειδάσης της λιγνίνης (VA⁺:ρίζα της βερατρυλικής αλκοόλης, Ph-O⁺: φαινολική ρίζα) (Gadd, 2001).

2.3.3. Υπεροξειδάση του Μαγγανίου

Η υπεροξειδάση του μαγγανίου, MnP, (EC 1.11.1.13), η οποία παράγεται αποκλειστικά από μερικούς βασιδιομύκητες, ανακαλύφθηκε αμέσως μετά την LiP από τους Kuwahara et al. (1984) και περιγράφηκε από τους Glenn και Gold (1985). Η MnP είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει αίμη και χρησιμοποιεί υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) για να οξειδώσει το ιόν Mn²⁺ σε ένα χηλικό σύμπλοκο του ιόντος Mn³⁺ (Gold et al., 1989). Το σχηματιζόμενο Mn³⁺ είναι ιδιαίτερα δραστικό και συμπλοκοποιείται με τα χηλικά οργανικά οξέα όπως οξαλικό ή μαλικό οξύ (Cui & Dolphin, 1990), τα οποία παράγονται από τους μύκητες (Hofrichter et al., 1999; Makela et al., 2002) και αποτελεί ένα εύκολα διαχεόμενο, μη ειδικευμένο οξειδωτικό σώμα. Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό της MnP είναι μικρότερο σε σύγκριση με την LiP και οξειδώνει επιλεκτικά τα φαινολικά υποστρώματα. Οι παραγόμενες φαινοξυλικές ρίζες αντιδρούν περαιτέρω αποικοδομώντας κατάλοιπα λιγνίνης μέχρι το σχηματισμό CO₂. Ο καταλυτικός κύκλος της MnP αρχίζει με τη δέσμευση του H₂O₂ στην αίμη, το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 2.7). Το H₂O₂ παράγεται από άλλα ένζυμα (GLOX, AAO) που εκκρίνει ο μύκητας ή από την MnP κατά την οξείδωση της γλουταθιόνης (GSH), NADPH και το διυδροξυ-μαλικό οξύ (dihydroxy malic acid). Η διάσπαση του δεσμού οξυγόνου-οξυγόνου απαιτεί τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από την αίμη, οπότε σχηματίζεται η MnP Ένωση I που περιέχει την οξυσιδηρούχο αίμη με την κατιοντική ρίζα της πορφυρίνης. Ακολουθεί η αναγωγή της Ένωσης I στη μορφή II με παράλληλη οξείδωση ιόντος Mn²⁺ σε Mn³⁺. Η σχηματιζόμενη Ένωση II είναι επίσης ικανή να οξειδώσει ένα ιόν Mn²⁺. Το στάδιο αυτό κλείνει τον κύκλο και η είσοδος ενός H₂O₂ καταλήγει στην παραγωγή δύο H₂O και δύο χηλικών ιόντων Mn³⁺ (Wariishi et al., 1992). Το Mn³⁺ ή το χηλικό σύμπλοκο του Mn³⁺ μπορεί με τη σειρά του να οξειδώσει μονομερείς ή διμερείς φαινόλες, καρβοξυλικά οξέα,θειόλες και ακόρεστα λιπαρά οξέα σχηματίζοντας τις αντίστοιχες ρίζες (Hofrichter, 2002).



Ο καταλυτικός κύκλος της MnP διαφέρει από τον κύκλο της LiP στο γεγονός ότι η Ένωση II ανάγεται άμεσα από το Mn²⁺ στην αρχική της μορφή (Wariishi et al., 1989). Οι φαινοξυλικές ρίζες σχηματίζονται επομένως από τη διάσπαση των δεσμών Ca- Cβ ή αλκυλ-φαίνυλο, προκαλώντας τον αποπολυμερισμό σε μικρότερα ενδιάμεσα προϊόντα, κινόνες και υδροξυκινόνες (Kuhad et al., 1997). Η οξείδωση φαινολικών ενώσεων ανάλογων της λιγνίνης από τη MnP οδηγεί στο σχηματισμό διάφορων μονομερών. Μη φαινολικές ενώσεις μπορούν να οξειδωθούν από τη MnP παρουσία οξυγόνου και GSH ή ακόρεστων λιπαρών οξέων.



Εικόνα 2.7: Ο καταλυτικός κύκλος της υπεροξειδάσης του μαγγανίου (Hofrichter, 2002)

2.4. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές λιγνινολυτικών ενζύμων

Η εφαρμογή των λιγνινολυτικών ενζύμων στη βιομηχανία και στη βιοτεχνολογία είναι ολοένα αυξανόμενη λόγω της χρήσης τους σε μία μεγάλη ποικιλία διεργασιών. Τα λιγνινολυτικά ένζυμα παρουσιάζουν δυνατότητες εφαρμογής σε πάρα πολλούς τομείς, μεταξύ των οποίων τα τρόφιμα, τα καύσιμα, η γεωργία κ.α. Το λιγνινολυτικό σύστημα των μυκητών λευκής σήψης παρουσιάζει πλεονέκτημα έναντι των φυσικών και χημικών μεθόδων επεξεργασίας καθώς τα λιγνινολυτικά ένζυμα είναι βιοδιασπώμενοι καταλύτες και οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ήπιες συνθήκες.

- Βιομηχανία τροφίμων

Η λακκάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες διεργασίες που ενισχύουν ή τροποποιούν το χρώμα των τροφίμων και των ποτών, μέσω της εξάλειψης των ανεπιθύμητων φαινολικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για την αμαύρωση και τη θολερότητα σε μύρα, κρασί και χυμό φρούτων (Maciel et al., 2010).

- Βιομηχανία υφασμάτων/χρωστικών

Οι υπάρχουσες διεργασίες επεξεργασίας των αποβλήτων από τις βιομηχανίες χρωστικών δεν είναι αποτελεσματικές και οικονομικές. Για αυτό το λόγο, η ανάπτυξη των διεργασιών που βασίζονται στη λακκάση αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη λύση, λόγω της δυνατότητας αποδόμησης χρωστικών με ποικιλία χημικής δομής συμπεριλαμβανομένων των συνθετικών βαφών που χρησιμοποιούνται σήμερα

ευρέως στη βιομηχανία. Η υπεροξειδάση της λιγνίνης έχει επίσης αξιολογηθεί στον αποχρωματισμό διάφορων συνθετικών βαφών. Τέλος, η υπεροξειδάση του μαγγανίου μπορεί εξ' ίσου να αποδομήσει χρωστικές ουσίες (Maciel et al., 2010).

- Βιομηχανία χαρτιού

Τα δύο βασικά βήματα στην παρασκευή χαρτιού είναι η πολτοποίηση και η λεύκανση. Στην πολτοποίηση, οι πρώτες ύλες μετατρέπονται σε ίνες με μηχανικές και χημικές μεθόδους. Ακολουθεί η διαδικασία της λεύκανσης που περιλαμβάνει την κατανάλωση τεράστιων ποσοτήτων χημικών, τα οποία αποτελούν πηγή μόλυνσης για το περιβάλλον. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, έχουν μελετηθεί βιολογικές διεργασίες που περιλαμβάνουν κυρίως τη χρήση της λακκάσης και είναι ασφαλείς για το περιβάλλον. Η λακκάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιο-πολτοποιητικό μέσο στην επεξεργασία του ξύλου καθώς μπορεί να αποικοδομήσει μερικώς τη λιγνίνη. Η βιο-πολτοποίηση εξοικονομεί ηλεκτρική ενέργεια, βελτιώνει την αντοχή του χαρτιού και είναι φιλική προς το περιβάλλον, λόγω της μειωμένης τοξικότητας των αποβλήτων. Η λακκάση που παράγεται από τον *T. versicolor* έχει μελετηθεί ευρέως για χρήση στη βιομηχανία χαρτιού (Agora and Sharma, 2010).

- Βιοεξυγίανση

Η λακκάση συμμετέχει στη βιοεξυγίανση ρυπασμένων περιοχών. Η βιοεξυγίανση είναι μια τεχνική εξυγίανσης, που χρησιμοποιεί βιολογικές διεργασίες για να καταστρέψει ή να μετατρέψει τους ρύπους. Η λακκάση μπορεί να αποδομήσει τις ξενοβιοτικές ενώσεις, που αποτελούν μία μεγάλη πηγή μόλυνσης του εδάφους. Επιπλέον, οι πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες αποδομούνται από τη λακκάση. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – PAHs) ανήκουν στην κατηγορία των επίμονων τοξικών ενώσεων και έχουν σοβαρές επιπτώσεις στον άνθρωπο και το περιβάλλον λόγω των μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων ιδιοτήτων τους. Σημαντικότερη πηγή ρύπανσης από PAHs είναι η βιομηχανία πετρελαίου (Maciel et al., 2010).

- Οργανικές, ιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές

Τον τελευταίο καιρό ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στην χρήση της λακκάσης ως νέου βιοκαταλύτη στην οργανική σύνθεση. Ο ενζυμικός πολυμερισμός με τη χρήση λακκάσης έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον αφού η λακκάση έχει την ικανότητα να παράγει κατευθείαν πολυμερή που είναι αδύνατο να παραχθούν μέσω συμβατικών χημικών συνθέσεων. Οι λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί για διάφορες εφαρμογές στην οργανική σύνθεση, όπως η οξειδωση λειτουργικών ομάδων, η σύζευξη των φαινολών και των στεροειδών, ως ιατρικοί παράγοντες (αναισθητικά, αντιφλεγμονώδη, αντιβιοτικά και ηρεμιστικά), στην δημιουργία δεσμών άνθρακα-αζώτου, στη σύνθεση περίπλοκων φυσικών προϊόντων και στις βιομηχανίες καλλυντικών (Maciel et al., 2010).

- Αποθείωση ορυκτών καυσίμων

Τα στερεά καύσιμα εκπέμπουν στις διεργασίες πριν και μετά την καύση επικίνδυνες ενώσεις που περιέχουν θείο. Η εκπομπή αυτών των χημικών μπορεί να μειωθεί με διάφορες χημικές και φυσικές μεθόδους αποθείωσης, που όμως απαιτούν πολύ έντονες συνθήκες όπως υψηλή θερμοκρασία και πίεση και έχουν υψηλό κόστος. Από την άλλη μεριά, η αποθείωση των ορυκτών καυσίμων με τη χρήση ενζύμων, όπως η λακκάση, μπορεί να γίνει σε ηπιότερες συνθήκες και να είναι μάλιστα και πιο αποτελεσματική (Agora and Sharma, 2010).

2.5. Καλλιεργούμενα εδώδιμα μανιτάρια

Σε όλες τις χώρες του κόσμου και κυρίως σε αυτές όπου ο πρωτογενής τομέας αποτελεί το μεγαλύτερο άξονα της οικονομίας τους, έχουν να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα της διάθεσης όλων των παραπροϊόντων της γεωργίας. Το μεγαλύτερο ποσοστό των υποπροϊόντων αυτών αποτελεί το άχυρο σιταριού γενικότερα, αλλά σε χώρες της Μεσογείου εξίσου σημαντικό πρόβλημα αποτελούν και τα υπολείμματα της καλλιέργειας της ελιάς, όπως επίσης και η διάθεση των στερεών αποβλήτων από τις διάφορες βιομηχανίες επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων λόγω των ιδιαίτερων χημικών χαρακτηριστικών τους. Η ιδιότητα των μυκήτων λευκής σήψης να μπορούν να αποδομούν την λιγνίνη άρα και τα λιγνινοκυτταρινούχα απόβλητα, αξιοποιήθηκε από τους ερευνητές για τη χρήση των υπολειμμάτων αυτών στην εμπορική καλλιέργεια των μανιταριών.

Η καλλιέργεια των μανιταριών αποτελεί μια σύγχρονη ελεγχόμενη εφαρμογή της βιοτεχνολογίας μεγάλης κλίμακας, για την επικερδή βιομετατροπή των λιγνινοκυτταρινούχων υπολειμμάτων και αποβλήτων της γεωργίας ή της δασοκομίας σε τροφή σημαντικής διαιτητικής αξίας. Ο ρόλος των μανιταριών στη γεωργική οικονομία είναι σημαντικός, καθώς κατά την παραγωγή τους χρησιμοποιούνται πρώτες ύλες μικρής οικονομικής αξίας, όπως υπολείμματα και παραπροϊόντα γεωργικών εκμεταλλεύσεων, βιομηχανιών τροφίμων, υλοτομίας και επεξεργασίας ξύλου, μετατρέπονται άχρηστα και ενδεχομένως περιβαλλοντικά επιζήμια οργανικά υλικά σε τροφή με αξιόλογες οργανοληπτικές ιδιότητες, παράγονται υποπροϊόντα, όπως το εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας, που διατίθεται περαιτέρω ως ζωοτροφές, βιολιπάσματα ή βελτιωτικά εδάφους.

Η παραγωγή των μανιταριών περιλαμβάνει 20 είδη και η ετήσια παραγωγή ανέρχεται σε 3.2 εκατομμύρια τόνους. Τα μανιτάρια *Agaricus bisporus* (white button mushroom), *Lentinula edodes* (shiitake) και *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) καλλιεργούνται σε μεγάλη κλίμακα παγκοσμίως. Άλλα είδη μανιταριών για κατανάλωση είναι τα εξής: *Agrocybe aegerita* (black poplar), *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma spp.*, *Grifola frondosa* (maitake, hen of the woods), *Hericium erinaceus* (lion's name, bearded tooth), *Hypsizygus marmoreus*

(beech mushroom), *Lepista nuda* (wood blewit), *Pholiota nameko* (nameko, golden needle mushroom), *Stropharia rigoannulata* (wine cap, king stropharia), *Volvariella volvacea* (Chang, 1999).

Οι σαπροφυτικοί βασιδιομύκητες είναι η κύρια κατηγορία των εδώδιμων μυκήτων. Παρόλα αυτά, οι μύκητες που χρησιμοποιούνται περισσότερο στις βιομηχανίες τροφίμων και ζυθοποιείες είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* (ζύμη ψωμιού) και άλλες *Saccharomyces* ζύμες, οι οποίοι ανήκουν στους ασκομύκητες. Τα καλλιεργούμενα μανιτάρια είναι αποδομητές του ξύλου και φυτικών υπολειμμάτων εδάφους. Τα πιο συνηθισμένα καλλιεργούμενα μανιτάρια και οι λιγνιολυτικές ιδιότητές τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4.

Η παραγωγή των μανιταριών είναι επικερδής τρόπος χρησιμοποίησης των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών. Απορρίμματα όπως άχυρο, πριονίδια, πίτυρο, κώνοι καλαμποκιού, κοτσάνια βάμβακος, κ.α. από τις αγροτικές, κτηνοτροφικές και κατασκευαστικές βιομηχανίες αποτελούν κατάλληλα υποστρώματα για την παραγωγή μανιταριών. Το οργανικό υπόστρωμα από την καλλιέργεια μανιταριών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτροφή ζώων ή ως λίπασμα (Cohen et al., 2002). Το οργανικό υπόστρωμα από την καλλιέργεια *Pleurotus spp.* έχει χρησιμοποιηθεί στη βιοενίσχυση εδαφών ρυπασμένων με πίσσα (Hestbjerg et al., 2003) και στην εξυγίανση εδαφών ρυπασμένων με PAHs (Lau et al., 2003).

Οι μύκητες λευκής σήψης φαίνεται ότι μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα γεωργικά υπολείμματα και να δώσουν μία ικανοποιητική παραγωγή, χωρίς να αλλοιώνεται η ποιότητα των παραγόμενων μανιταριών.

Πίνακας 2.3: Τα πιο συνήθη καλλιεργούμενα εδώδιμα μανιτάρια και οι λιγνινολυτικές τους ιδιότητες.

Μύκητας	Είδος αποδόμησης	Υπόστρωμα καλλιέργειας	Λιγνινολυτικ ά ένζυμα
<i>Agaricus bisporus</i>	Αποδομητής φυτικών υπολειμμάτων	Άχυρο, λίπασμα, κοπριά	Lac, MnP
<i>Lentinula edodes</i>	Μύκητας λευκής σήψης	Κορμοί βελανιδιάς, πριονίδια και πίτουρα	MnP Lac
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Μύκητας λευκής σήψης	Λιγνινοκυτταρινούχα υπολείμματα, άχυρο δημητριακά, πριονίδια, κατάλοιπα αποχύμωσης, υπολείμματα βαμβακιού	Lac VP MnP
<i>Volvariella volcanea</i>	Αποδομητής φυτικών υπολειμμάτων	Άχυρο, μπανάνα, απόβλητα ξύλου ή βαμβακιού	Lac
<i>Auricularia auricula</i>	Μύκητας λευκής σήψης	Κορμοί δέντρων, πριονίδια/δημητριακά ή πίτουρα	MnP, Lac

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 3.
Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Υλικά

3.1.1. Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν 3 μικροοργανισμοί που ανήκουν στους βασιδιομύκητες λευκής σήψης. Οι μικροοργανισμοί αυτοί προμηθεύτηκαν από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και είναι οι:

- *Pleurotus citrinopileatus* LGAM 28684
- *Irpex lacteus* LGAM 238
- *Ganoderma lucidum* LGAM 9720

Η ταξινόμηση τους είναι η ακόλουθη:

Πίνακας 3.1: Συστηματική ταξινόμηση χρησιμοποιούμενων βασιδιομυκήτων (Mycobank)

	<i>P.Citrinopileatus</i>	<i>I.Lacteus</i>	<i>G.Lucidum</i>
Βασίλειο	Fungi	Fungi	Fungi
Φύλο	Basidiomycota	Basidiomycota	Basidiomycota
Κλάση	Agaricomycetes	Agaricomycetes	Agaricomycetes
Τάξη	Agaricales	Polyporales	Polyporales
Οικογένεια	Pleurotaceae	Meruliaceae	Ganodermataceae
Γένος	<i>Pleurotus</i>	<i>Irpex</i>	<i>Ganoderma</i>
Είδος	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	<i>Irpex lacteus</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>

3.1.2. Χημικά αντιδραστήρια – Αναλώσιμα υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma – Aldrich (Η.Π.Α.), Panreac (Ισπανία), Applichem (Γερμανία), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και Fisher Scientific (Η.Π.Α), και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SIMAX (Τσεχία), SCHOTT AG (Γερμανία), BOMEX (Κίνα) και ISO LAB (Γερμανία).

3.1.3. Συσκευές και Όργανα

Παρουσιάζονται οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Κίνα)
- Επωαστήρας Orbital incubator S150, Stuart Scientific (Μ. Βρετανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying) Christ ALPHA 1-4, B. Braun Biotec. International, Melsungen (Γερμανία)
- Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντρος Beckman Coulter (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς)
- Φωτόμετρο SPECTRAmax 250 (Molecular Devices, Η.Π.Α.)

3.1.4. Θρεπτικά υποστρώματα

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για τις προκαλλιέργειες των μικροοργανισμών αποτελούνταν από απόβλητο ελαιουργείου κατάλληλα επεξεργασμένου (κεφ. 3.3), αραιωμένο 1:4 με απιονισμένο νερό. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος προστέθηκε άγαρ σε συγκέντρωση 15 g l^{-1} . Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min και τέλος μοιράστηκε σε τρυβλία Petri. Κάθε τρυβλίο Petri περιέχει περίπου 25 ml υποστρώματος.

Χρησιμοποιήθηκε ακόμα PDA (potato dextrose agar) ως θρεπτικό υπόστρωμα στα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν ως stock για τον εμβολιασμό των προκαλλιιεργειών.

3.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη ρύθμιση του pH στις καλλιέργειες φαίνονται στον πίνακα. Η συγκέντρωση όλων των ρυθμιστικών διαλυμάτων ήταν 100mM.

Πίνακας 3.2: Σύσταση χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων

pH	Ρυθμιστικό Διάλυμα
4	CH ₃ COOH – CH ₃ COONa
5	K ₂ HPO ₄ - KH ₂ PO ₄
6	
7	
8	
9	H ₃ BO ₃ - NaOH

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της λακκάσης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα C₆H₈O₇ – K₂HPO₄ (C=100 mM) με pH=4.

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Μέτρηση ενεργότητας λακκάσης

Ένα από τα κύρια ένζυμα που παράγουν οι βασιδιομύκητες και στο οποίο οφείλεται η διάσπαση των φαινολικών ενώσεων είναι η λακκάση. Η λακκάση είναι μία πολυφαινολική οξειδάση που περιέχει χαλκό στο μόριο της και χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο για να οξειδώσει διάφορες αρωματικές και μη ενώσεις μέσω ενός μηχανισμού αντίδρασης με ρίζες. Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών και των υδροξυλομάδων της λιγνίνης από το ένζυμο λακκάση πραγματοποιείται με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου και το σχηματισμό ριζών, οι οποίες είναι πολύ δραστικές και μπορούν να προκαλέσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις (Thurston, 1994).

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της λακκάσης πραγματοποιείται φασματοφωτομετρικά. Φασματοφωτομετρία είναι η τεχνική στην οποία χρησιμοποιείται φως για τη μέτρηση της συγκέντρωσης χημικών ουσιών. Η συγκέντρωση χημικών ουσιών συνδέεται με την απορρόφηση με την εξίσωση:

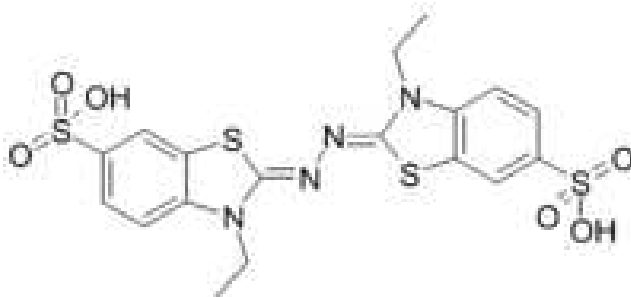
$$A = \epsilon * b * C$$

Η παραπάνω εξίσωση ονομάζεται νόμος των Beer-Lambert. Η απορρόφηση, A, δεν έχει μονάδες (είναι αδιάστατη). Η συγκέντρωση ενός δείγματος, C, δίνεται συνήθως σε μονάδες mol l⁻¹ (M). Η οπτική διαδρομή, b, δίνεται συνήθως σε εκατοστόμετρα. Η ποσότητα ε ονομάζεται γραμμομοριακή απορροφητικότητα και έχει μονάδες M⁻¹ cm⁻¹, ώστε το πολλαπλάσιο εbC να γίνει αδιάστατο. Η γραμμομοριακή απορροφητικότητα είναι το χαρακτηριστικό της ουσίας που δηλώνει πόσο φως απορροφάται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (Harris, 2007).

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της λακκάσης περιλαμβάνει φωτομέτρηση στο φωτόμετρο SPECTRAmax 250 στα 420 nm και σε θερμοκρασία 25°C.

Το αντιδραστήριο αυτής της μεθόδου είναι το 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) ή αλλιώς ABTS. Το ABTS είναι ένα τεχνητό υπόστρωμα, για την ακρίβεια ένα ψευδουπόστρωμα με δομή παρεμφερή με της λιγνίνης. Με οξείδωση αυτού του αντιδραστηρίου παράγεται κατιόν $ABTS^+$, το οποίο έχει έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα (Bourbonnais & Paice, 1990).

Ο συντακτικός τύπος είναι:



Εικόνα 3.1: Δομή $ABTS^+$

Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 250 μl και η ποσότητα του δείγματος στην αντίδραση είναι 25 μl. Το buffer που χρησιμοποιείται είναι $C_6H_8O_7 - K_2HPO_4$ ($C=100$ mM) με $pH=4$, ενώ το υπόστρωμα ABTS είναι σε συγκέντρωση 0,5 mM.

Η μέγιστη απορρόφηση του δείγματος παρατηρείται στα 10 min της αντίδρασης, καθώς μετά η απορρόφηση σταθεροποιείται.

Η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση προϊόντος πραγματοποιείται με χρήση του νόμου Beer-Lambert, όπου $\epsilon=36000$ $M^{-1} cm^{-1}$ και $b=0,6$ cm.

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit, U), ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol υποστρώματος ανά 1 min στις προαναφερθείσες συνθήκες.

3.2.2. Μέτρηση ολικών φαινολών

Η διάσπαση των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου που προέρχεται από τη δράση του εκάστοτε μικροοργανισμού, προσδιορίζεται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξείδωση του συνόλου των φαινολικών συστατικών, σε αλκαλικό περιβάλλον από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Το αντιδραστήριο αυτό αποτελείται από ένα μίγμα φωσφοροβολφραμικού οξέος ($H_3PW_{12}O_{40}$), το οποίο ανάγεται κατά την οξείδωση των φαινολών, σε μίγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το κυανό χρώμα που προκύπτει παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750 nm, και έτσι είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών. Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

❖ Παρασκευή κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3

Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 50 g άνυδρου Na_2CO_3 σε 200 ml απιονισμένο νερό. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού υπό ανάδευση και εν συνεχεία αφήνεται να ψυχθεί. Προστίθενται μερικοί κρύσταλλοι άνυδρου Na_2CO_3 και το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 24 h. Ακολουθεί διήθηση με ταυτόχρονη μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη 250 ml η οποία συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

❖ Παρασκευή διαλύματος γαλλικού οξέος (stock solution)

Σε ογκομετρική φιάλη 50 ml προστίθενται:

- 0,255 g γαλλικό οξύ
- 5 ml αιθανόλη
- απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή

❖ Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέως

Σε ογκομετρικές φιάλες των 50 ml προστίθενται 0, 0.5, 1, 1.5, 2.5 και 5 ml από το stock διάλυμα γαλλικού οξέως και ακολουθεί συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Οι περιεκτικότητες των διαλυμάτων που προκύπτουν είναι 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg l^{-1} αντίστοιχα.

❖ Μέτρηση ολικού φαινολικού φορτίου δείγματος

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται:

- -3,95 ml απιονισμένο νερό
- -50 μl δείγμα (ή πρότυπο στην περίπτωση της καμπύλης αναφοράς)
- -250 μl αντιδραστήριο Folin.

Ακολουθεί ανάδευση σε vortex. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία 30 s - 8 min και εν συνεχεία προστίθενται 750 μl από το διάλυμα Na_2CO_3 . Ακολουθεί ανάδευση και πάλι σε vortex. Το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 30 min σε υδατόλουτρο στους 40°C . Ακολουθεί φωτομέτρηση του δείγματος σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης στα 765nm με τυφλό, αντιστοίχως παρασκευασμένο δείγμα όπου στη θέση των 50 μl δείγματος, προστέθηκαν 50 μl ρυθμιστικό διάλυμα. Αν κρίνεται απαραίτητο το δείγμα αραιώνεται 10 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα, έτσι ώστε να προκύψει η κατάλληλη οπτική απορρόφηση (Waterhouse, 2001).

3.2.2.1. Μέτρηση ολικών φαινολών βιομάζας

Στη μέθοδο αυτή προστίθεται ποσότητα υγρού αζώτου στην παραχθείσα βιομάζα και ακολουθεί κονιοποίηση της σε γουδί. Η κονιοποιημένη βιομάζα διαλυτοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα (pH 6). Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση. Τέλος, πραγματοποιείται μέτρηση ολικών φαινολών στο υπερκείμενο υγρό όπως περιγράφηκε παραπάνω.

3.2.3. Αποχρωματισμός αποβλήτου

Ο αποχρωματισμός της καλλιέργειας προσδιορίζεται φωτομετρικά με φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302 σε μήκος κύματος 525 nm. Τα δείγματα προηγουμένως αραιώνονται 10 φορές με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Το ποσοστό αποχρωματισμού προκύπτει από τη σύγκριση του εκάστοτε δείγματος με τον κατάλληλο μάρτυρα.

3.2.4. Μέτρηση βιομάζας και pH

Στο τέλος της καλλιέργειας πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του υγρού της καλλιέργειας (3000 rpm για 20 min). Ακολουθούν όλες οι αναλύσεις στο υπερκείμενο υγρό που προκύπτει. Επιπλέον, ελέγχεται το pH του κάθε δείγματος στο τέλος της καλλιέργειας.

Το ίζημα που προκύπτει από τη φυγοκέντρηση υφίσταται έκπλυση 2 φορές με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια φυγοκεντρείται εκ νέου (3000 rpm για 20 min). Το νέο ίζημα τοποθετείται σε συσκευή λυοφιλίωσης, όπου παραμένει για δύο ημέρες και στη συνέχεια ζυγίζεται για να προσδιορισθεί η παραχθείσα βιομάζα. Η μέθοδος της ξήρανσης με λυοφιλίωση συνίσταται στην κατάψυξη του υπό ξήρανση υλικού και κατόπιν την εξάχνωση του σχηματισθέντος πάγου μέσα στο κατεψυγμένο υλικό, ώστε να παραχθεί το αφυδατωμένο προϊόν.

3.2.5. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων

Η μέτρηση αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), όπως πρότεινε ο Miller (1959). Ως αναγωγικό σάκχαρο ορίζεται το σάκχαρο εκείνο που έχει ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο. Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο προαναφερθέν υδροξύλιο και το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ κατά τη θέρμανση σε θερμοκρασία πάνω από 70°C. Το σύμπλοκο αυτό εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540 nm.

Αναλυτικά η μέτρηση έχει ως εξής: Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 250 μl δείγματος κατάλληλα αραιωμένου και 250 μl αντιδραστηρίου DNS. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε νερό που βράζει για 5 min και στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 2 ml απιονισμένου νερού και πραγματοποιείται πάλι ανάδευση σε vortex. Τέλος, πραγματοποιείται φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 540 nm. Η απορρόφηση που προκύπτει ανάγεται σε ισοδύναμη συγκέντρωση γλυκόζης με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς.

3.2.6. Μέτρηση ενεργότητας υπεροξειδασών

Η υπεροξειδάση της λιγνίνης (Lignin peroxidase, LiP) και η υπεροξειδάση του μαγγανίου (Manganese peroxidase, MnP) ανήκουν στην κατηγορία των υπεροξειδασών και είναι γλυκοπρωτείνες, που περιέχουν μια προσθετική ομάδα αίμης, και ανάγουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό.

Η υπεροξειδάση της λιγνίνης οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η ενδιάμεση (οξειδωμένη) μορφή της επανέρχεται στην αρχική της κατάσταση, προσλαμβάνοντας τα δύο ηλεκτρόνια που της λείπουν από τον αρωματικό δακτύλιο του υποστρώματος, μέσω δύο οξειδωτικών αντιδράσεων (Kirk & Farrell, 1987).

Η διαφορά της MnP από τις συμβατικές υπεροξειδάσες, είναι ότι το Mn^{2+} είναι ο υποχρεωτικός δότης, που δίνει στο ένζυμο το ένα ηλεκτρόνιο που του λείπει, για να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση και ταυτόχρονα μετατρέπεται σε Mn^{3+} . Η αντίδραση αυτή απαιτεί την παρουσία χηλικών οργανικών οξέων, όπως το οξαλικό, που σταθεροποιούν το Mn^{3+} και προάγουν την ελευθέρωσή του από το ένζυμο (Gadd, 2001).

Η μέτρηση της ενεργότητας των υπεροξειδασών στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται έμμεσα, μέσω της ενεργότητας της λακκάσης. Για το λόγο αυτό, το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι το ABTS, που όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως είναι ένα τεχνητό υπόστρωμα με δομή παρεμφερή με αυτή της λιγνίνης. Η μέτρηση πραγματοποιείται στα 420 nm και σε θερμοκρασία 25°C.

Στην αντίδραση για τον προσδιορισμό της υπεροξειδάσης της λιγνίνης το υπόστρωμα ABTS βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,5 mM ενώ το H_2O_2 σε συγκέντρωση 1 mM. Ο όγκος του δείγματος που προστίθεται είναι 25 μ l και ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 250 μ l.

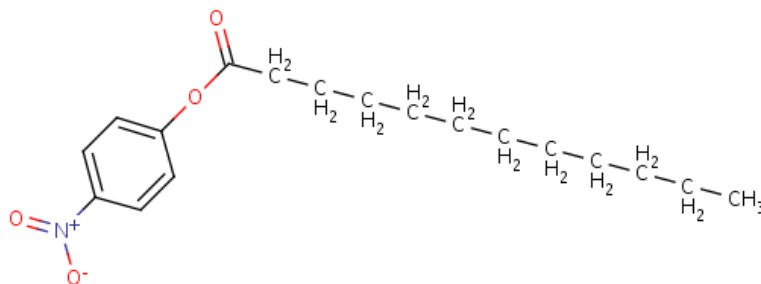
Αντίστοιχα, στην περίπτωση της υπεροξειδάσης του μαγγανίου το υπόστρωμα ABTS βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,5 mM ενώ το H_2O_2 και το $MnSO_4$ σε συγκέντρωση 1 mM. Ο όγκος του δείγματος που προστίθεται είναι 25 μ l και ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 250 μ l.

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit, U), ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μ mol υποστρώματος ανά 1 min στις προαναφερθείσες συνθήκες.

3.2.7. Μέτρηση ενεργότητας λιπάσης

Οι λιπάσες (EC 3.1.1.3) ανήκουν στη κατηγορία των υδρολυτικών ενζύμων (υδρολάσες) και συγκεκριμένα στις υδρολάσες των καρβοξυλεστέρων. Τα ένζυμα αυτά επιδρούν στους εστερικούς δεσμούς των γλυκεριδίων των ελαίων και λιπών υδρολύοντάς τους (Svendsen, 2000).

Για την ανίχνευση της δραστηριότητας της λιπάσης χρησιμοποιήθηκε συνθετικό υπόστρωμα και συγκεκριμένα ο εστέρας της 4-νιτροφαινόλης με το λαυρικό οξύ (p-nitrophenyl laurate, pNp-L). Η λιπάση δρα διασπώντας το δεσμό μεταξύ της 4-νιτροφαινόλης και του λαυρικού οξέος. Η ελεύθερη μορφή του pNp έχει διαφορετικό χρώμα από το pNp-L και μπορεί να προσδιορισθεί φωτομετρικά και να ποσοτικοποιηθεί με τη βοήθεια κατάλληλης καμπύλης αναφοράς. Η μέτρηση πραγματοποιείται στα 410 nm ενώ η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 30°C.



Εικόνα 3.2: Δομή pNp-L ($C_{18}H_{27}NO_4$)

Παρασκευάζονται τα εξής διαλύματα:

- Διάλυμα 1: pNp-L (9 mM)
- Διάλυμα 2: 58 ml ρυθμιστικό διάλυμα K_2HPO_4 (100 mM) – KH_2PO_4 (100 mM) με pH 7, 0,06 gr gum arabic και 0,2 ml Triton

Το διάλυμα 1 αραιώνεται 1:10 με το διάλυμα 2 για να παρασκευαστεί το τελικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στην αντίδραση.

Στον τελικό όγκο της αντίδρασης (300 μ l) το pNp-L βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,5 mM, ενώ η ποσότητα του δείγματος που προστίθεται είναι 50 μ l.

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit, U), ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μ mol υποστρώματος ανά 1 min στις προαναφερθείσες συνθήκες.

3.3. Κατεργασία αποβλήτου

Ως θρεπτικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών χρησιμοποιείται απόβλητο ελαιουργείου, συγκεκριμένα κασίγαρος, το οποίο προηγουμένως πρέπει να υποστεί κατεργασία. Ο κασίγαρος είναι τα υγρά απόβλητα που προκύπτουν από την παραγωγική διαδικασία σε ένα φυγοκεντρικό ελαιοτριβείο τριών φάσεων και συνίσταται από το υδατικό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και από το νερό που χρησιμοποιείται στις διάφορες φάσεις παραγωγής του λαδιού στο ελαιουργείο. Συγκεκριμένα στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε κασίγαρος από ελαιουργείο στην περιοχή της Καλαμάτας.

Η προκατεργασία του αποβλήτου περιλαμβάνει ρύθμιση του pH του στο 6 με τη χρήση NaOH 3N και εν συνεχεία φυγοκέντρωση και διήθηση υπό κενό. Η φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται 2 φορές, αρχικά στα 8000 rpm για 20 min και μετά στα 4000 rpm για 20 min. Το υπερκείμενο υφίσταται διήθηση υπό κενό με διηθητικό χαρτί Whatman No.1 και συλλέγεται το διήθημα.

3.4. Προκαλλιέργειες μικροοργανισμών

Οι προκαλλιέργειες των βασιδιομυκήτων πραγματοποιούνται αρχικά σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar). Τα τρυβλία αυτά χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό νέων τρυβλίων με απόβλητο σε συγκέντρωση 25% (v/v) ως μόνη πηγή άνθρακα και ενέργειας. Όλοι οι εμβολιασμοί γίνονται σε στείρες συνθήκες. Ο μέσος χρόνος ανάπτυξης των βασιδιομυκήτων στα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα το απόβλητο είναι 10 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου.

3.5. Υγρές καλλιέργειες μικροοργανισμών

Οι καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε γυάλινες κωνικές φιάλες των 100 ml. Το απόβλητο, που αποτελεί το θρεπτικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια και μάλιστα τη μοναδική πηγή άνθρακα, χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 25% (v/v) αραιωμένο με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό pH (κεφ. 3.1.5). Για κάθε συνθήκη χρησιμοποιούνται 3 κωνικές φιάλες, εκ των οποίων η μία λειτουργεί ως μάρτυρας, δηλαδή δεν εμβολιάζεται με τον μικροοργανισμό. Ο όγκος της κάθε καλλιέργειας είναι 30 ml. Ακολουθεί αποστείρωση των υποστρωμάτων σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 min. Εν συνεχεία, τα υποστρώματα εμβολιάζονται με τον μικροοργανισμό σε στείρες συνθήκες. Ο εμβολιασμός γίνεται με κομμάτι μικροοργανισμού μεγέθους 1 cm², όλα κομμένα από την ίδια περιφέρεια του τρυβλίου προκειμένου να βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης. Οι κωνικές φιάλες πωματίζονται με υδρόφοβο βαμβάκι. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 25°C υπό

ανάδευση (80 rpm) σε επωαστήρα. Η καλλιέργεια διαρκεί περίπου 20 ημέρες, ανάλογα με τον κάθε μικροοργανισμό.

Καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας λαμβάνεται δείγμα (500 μ l) από κάθε γυάλινη κωνική φιάλη, το οποίο εν συνεχεία φυγοκεντρείται για 10 min. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε φιαλίδια errendorf και χρησιμοποιείται για τις μετέπειτα αναλύσεις. Η δειγματοληψία πραγματοποιείται τις ακόλουθες ημέρες της καλλιέργειας: 3^η, 5^η, 7^η, 10^η, 13^η, 16^η, 19^η, 22^η ημέρα.

Η παραπάνω διαδικασία καλλιέργειας και δειγματοληψίας ακολουθείται και για τα 3 στελέχη (*P. citrinopileatus*, *I. lacteus*, *G. lucidum*).

Τέλος, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση διάφορων πηγών αζώτου στην ανάπτυξη και τη λιγνινολυτική δραστηριότητα των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι ακόλουθες χημικές ενώσεις:

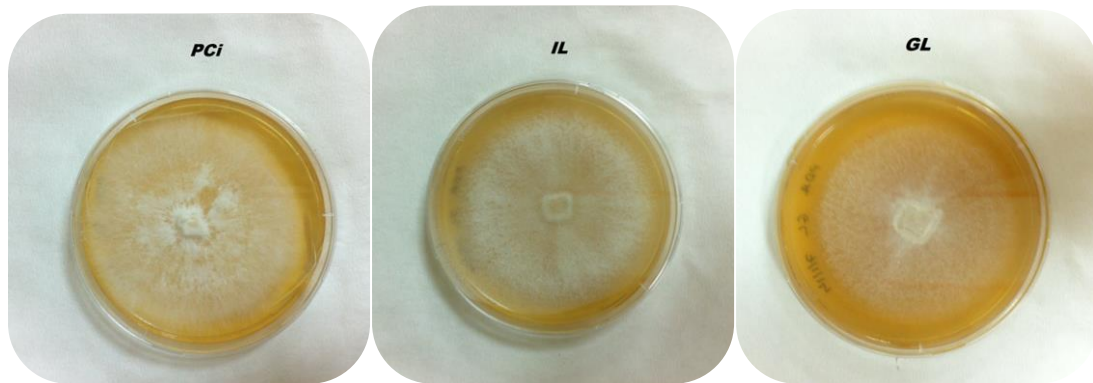
1. Τρυγικό διαμμώνιο ($C_4H_{12}N_2O_6$)
2. Νιτρικό κάλιο (KNO_3)
3. Νιτρικό αμμώνιο (NH_4NO_3)
4. Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)
5. Εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού (Corn steep liquor)

Αποτελέσματα
και συμπεράσματα

Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα

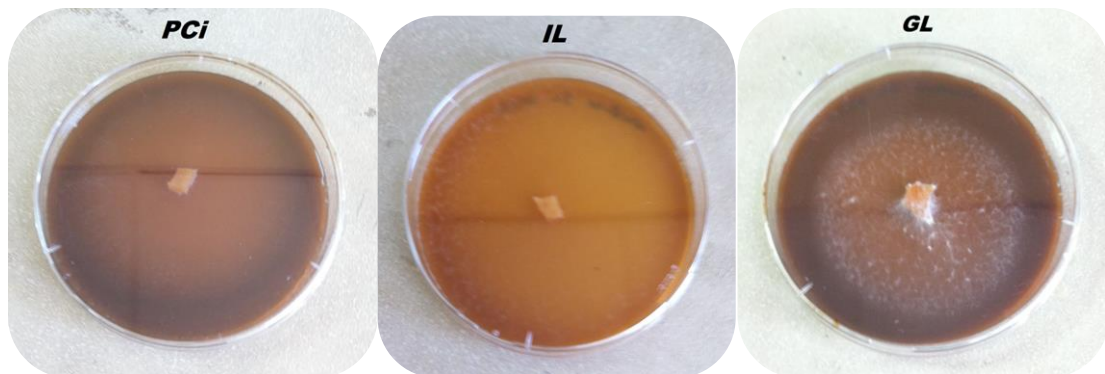
4.1.Στερεές καλλιέργειες

Οι προκαλλιέργειες των μικροοργανισμών σε τρυβλία περιγράφονται στην παράγραφο 3.4. Στην Εικόνα 4.1 φαίνεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA την 10^η ημέρα επώασης.



Εικόνα 4.1: Ανάπτυξη στελεχών σε PDA

Στην Εικόνα 4.2 φαίνεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα απόβλητο ελαιουργείου την 15^η ημέρα επώασης.



Εικόνα 4.2: Ανάπτυξη στελεχών σε απόβλητο (15^η ημέρα)

Όπως φαίνεται από τις εικόνες το στέλεχος *I. lacteus* κατάφερε σε μεγάλο βαθμό να αποχρωματίσει το απόβλητο στις στερεές καλλιέργειες.

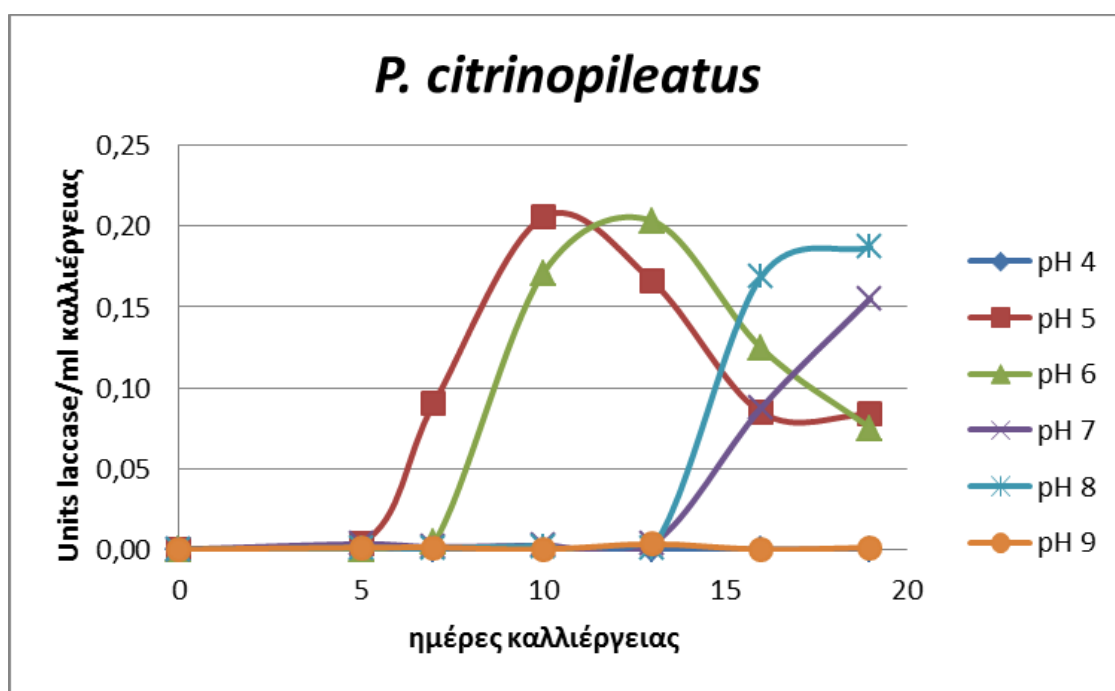
4.2. Πείραμα Α. Εύρεση βέλτιστου pH καλλιέργειας

4.2.1. Εισαγωγή

Σκοπός του πειράματος είναι η εύρεση του βέλτιστου pH για την καλλιέργεια του κάθε στελέχους. Για τον σκοπό αυτό, οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ένα εύρος διαφορετικών pH από 4 έως 9. Η διαδικασία που ακολουθείται για τις υγρές καλλιέργειες περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.5. Με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ρυθμίζεται το κάθε pH στις καλλιέργειες (παράγραφος 3.1.5). Η επιλογή του βέλτιστου pH για την καλλιέργεια του κάθε στελέχους γίνεται με τα εξής κριτήρια: α) ενεργότητα, β) παραχθείσα βιομάζα, γ) διάσπαση φαινολικών ενώσεων και δ) αποχρωματισμός αποβλήτου.

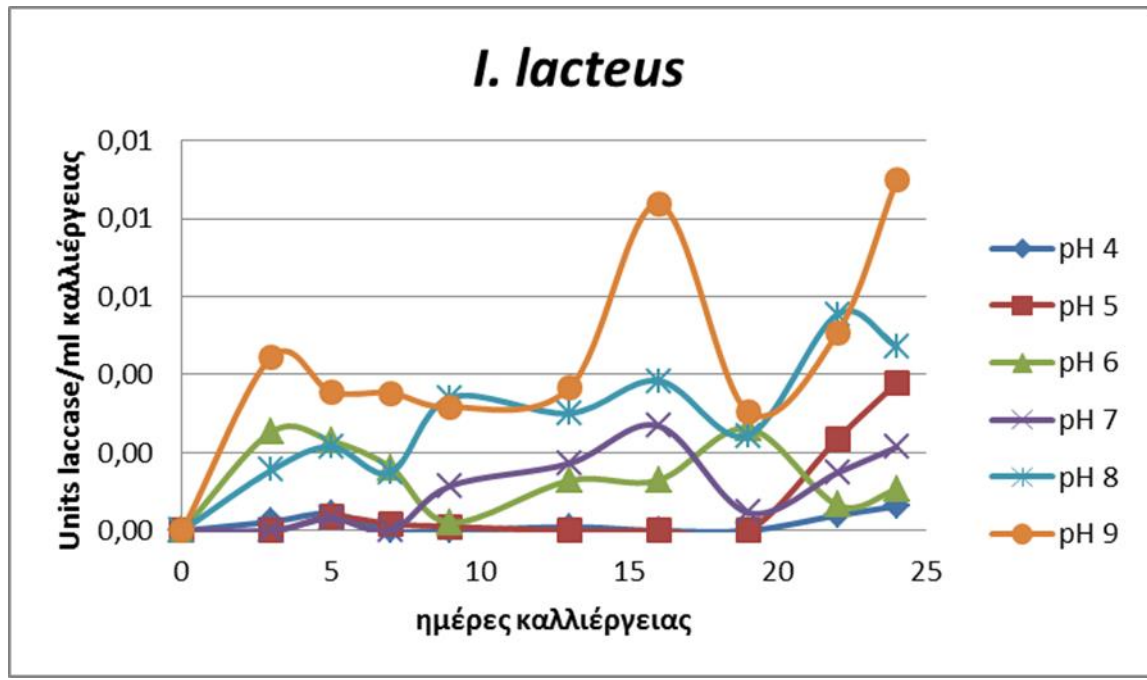
4.2.2. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης

Στα διαγράμματα 4.1, 4.2 και 4.3 παρουσιάζεται η μεταβολή της ενεργότητας της λακκάσης σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας του κάθε στελέχους. Κάθε τιμή προκύπτει από το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.



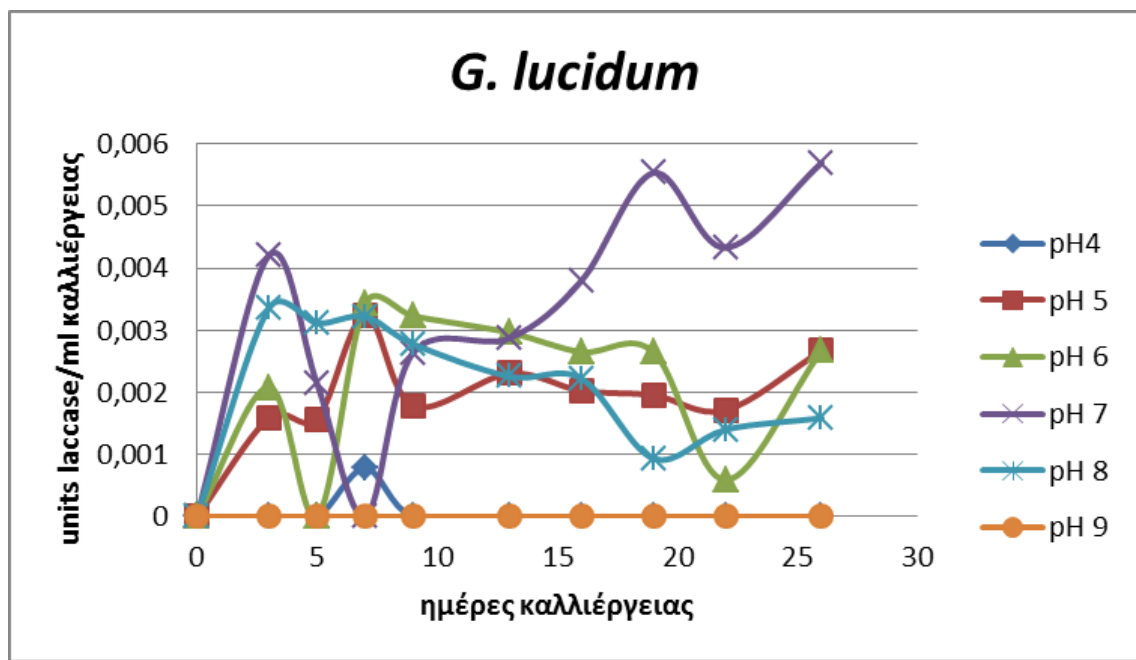
Διάγραμμα 4.1: Ενεργότητα λακκάσης (στέλεχος *P. citrinopileatus*)

Δεν παρατηρήθηκε ενεργότητα λακκάσης από το μύκητα *P. citrinopileatus* στα ακραία pH 4 και 9, ενώ εμφάνισε υψηλή ενεργότητα λακκάσης σε όλες τις υπόλοιπες συνθήκες και κυρίως στα pH 5 και 6.



Διάγραμμα 4.2: Ενεργότητα λακκάσης (στέλεχος *I. lacteus*)

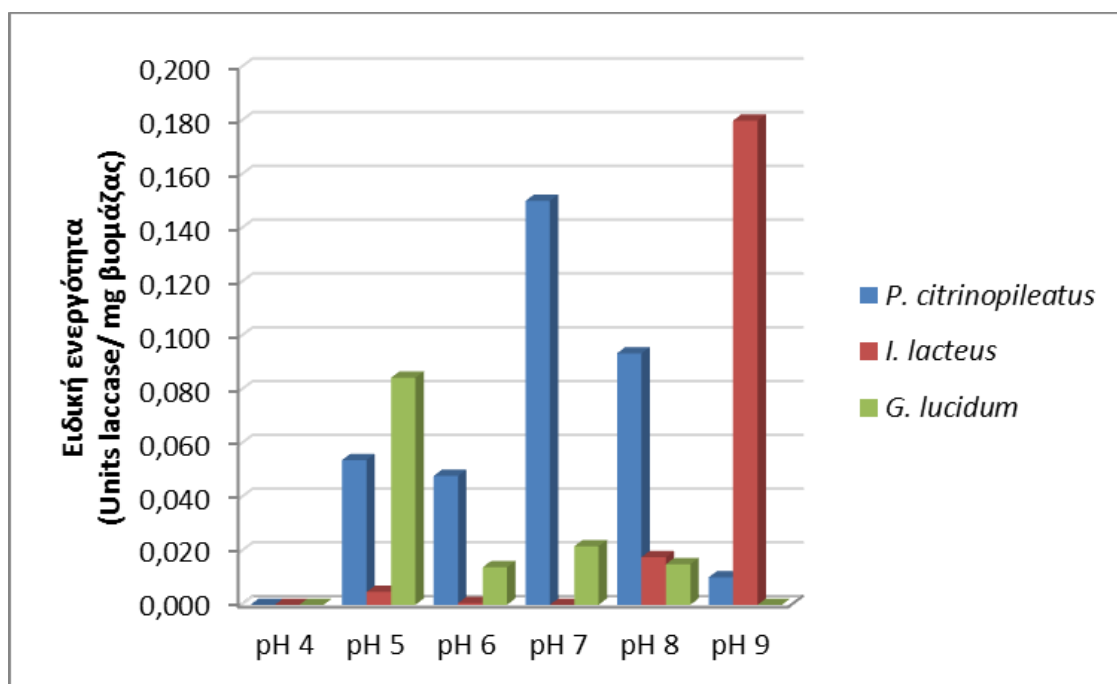
Ο βασιδιομύκητας *I. lacteus* εμφανίζει μέγιστη ενεργότητα λακκάσης σε pH καλλιέργειας 9.



Διάγραμμα 4.3: Ενεργότητα λακκάσης (στέλεχος *G. lucidum*)

Τέλος, ο βασιδιομύκητας *G. lucidum* εμφανίζει μέγιστη ενεργότητα λακκάσης σε pH 7. Όπως γίνεται φανερό από τα τρία διαγράμματα, η παραγωγή λακκάσης στα στελέχη *I. lacteus* και *G. lucidum* είναι τουλάχιστον μία τάξη μεγέθους μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη στο στέλεχος *P. citrinopileatus*.

Στο διάγραμμα και τον πίνακα που ακολουθούν παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα των τριών στελεχών στο τέλος της καλλιέργειας τους. Η ειδική ενζυμική ενεργότητα ορίζεται ως η ενζυμική ενεργότητα (U) ανά mg ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 4.4: Ειδική ενζυμική ενεργότητα λακκάσης

pH	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
4	0,000	0,000	0,000
5	0,054	0,005	0,084
6	0,048	0,001	0,014
7	0,150	0,000	0,022
8	0,094	0,018	0,015
9	0,010	0,180	0,000

Πίνακας 4.1: Ειδική ενζυμική ενεργότητα λακκάσης (U mg⁻¹)

Υψηλότερη ειδική ενζυμική ενεργότητα λακκάσης (0,180 U mg⁻¹) εμφανίζει το στέλεχος *I. lacteus* όταν καλλιεργείται σε pH 9. Εξίσου υψηλή ειδική ενεργότητα (0,150 U mg⁻¹) εμφανίζει το στέλεχος *P. citrinopileatus* όταν καλλιεργείται σε pH 7.

4.2.3. Μετρήσεις βιομάζας

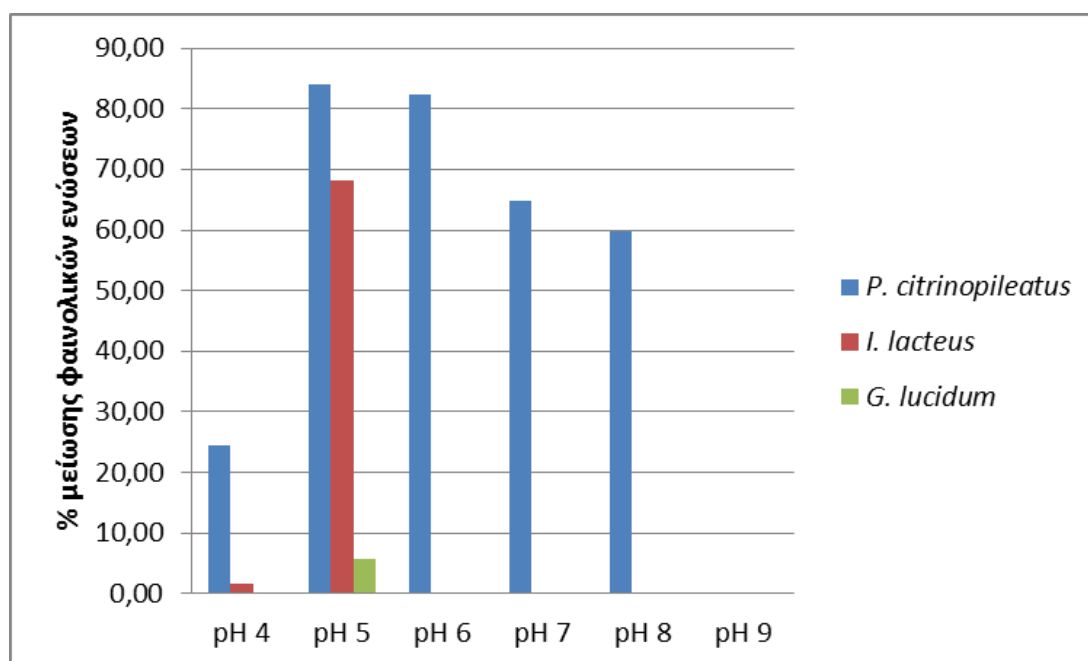
Στον Πίνακα 4.2 φαίνεται η παραχθείσα βιομάζα από κάθε καλλιέργεια. Το βάρος της βιομάζας εκφράζεται σε mg ml^{-1} καλλιέργειας. Προκύπτει ότι το στέλεχος *P. citrinopileatus* παρήγαγε περισσότερη βιομάζα στις καλλιέργειες με pH 5,6,7 και 8, το στέλεχος *I. lacteus* σε pH 6 και το στέλεχος *G. lucidum* σε pH 7.

pH	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
4	0,633	0,000	0,117
5	1,550	0,800	0,032
6	1,567	1,617	0,192
7	1,033	0,000	0,262
8	2,000	0,267	0,105
9	0,117	0,050	0,000

Πίνακας 4.2: Βιομάζα στο τέλος της καλλιέργειας (mg ml^{-1})

4.2.4. Μέτρηση φαινολικών ενώσεων

Ο προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων σε διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή σε κάθε διαφορετικό pH, στο τέλος της καλλιέργειας.



Διάγραμμα 4.5: % μείωσης φαινολικών ενώσεων

Ο *P. citrinopileatus* αποικοδόμησε τις φαινολικές ενώσεις του κατσίγαρου σε ποσοστό μεγαλύτερο από 60% στις καλλιέργειες με pH από 5 έως 8. Το στέλεχος *I. lacteus* πέτυχε ουσιαστική αποικοδόμηση του κατσίγαρου στην καλλιέργεια με pH 5. Τέλος, στην περίπτωση του στελέχους *G. lucidum*, δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μείωση του φαινολικού φορτίου.

Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζεται συγκεντρωτικά το ποσοστό διάσπασης των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου από τα 3 στελέχη.

pH	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
4	24,53	1,70	0,00
5	83,97	68,07	5,73
6	82,34	0,00	0,00
7	64,86	0,00	0,00
8	59,80	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00

Πίνακας 4.3: Διάσπαση φαινολικών ενώσεων (%)

4.2.5. Αποχρωματισμός αποβλήτου

Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζεται το ποσοστό αποχρωματισμού του αποβλήτου για το κάθε στέλεχος σε κάθε διαφορετικό pH καλλιέργειας.

pH	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
4	83,93	10,54	40,44
5	39,77	29,98	0,00
6	39,39	0,00	0,00
7	0,00	0,00	9,04
8	14,59	0,00	0,00
9	0,00	0,00	9,86

Πίνακας 4.4: Αποχρωματισμός αποβλήτου (%)

4.3.Πείραμα Β. Εύρεση βέλτιστου ρυθμού ανάδευσης

4.3.1. Εισαγωγή

Σκοπός του πειράματος είναι η εύρεση του βέλτιστου ρυθμού ανάδευσης για την καλλιέργεια του κάθε στελέχους. Για τον σκοπό αυτό εξετάζονται τρεις διαφορετικές συνθήκες:

1. 0 rpm
2. 75 rpm
3. 150 rpm.

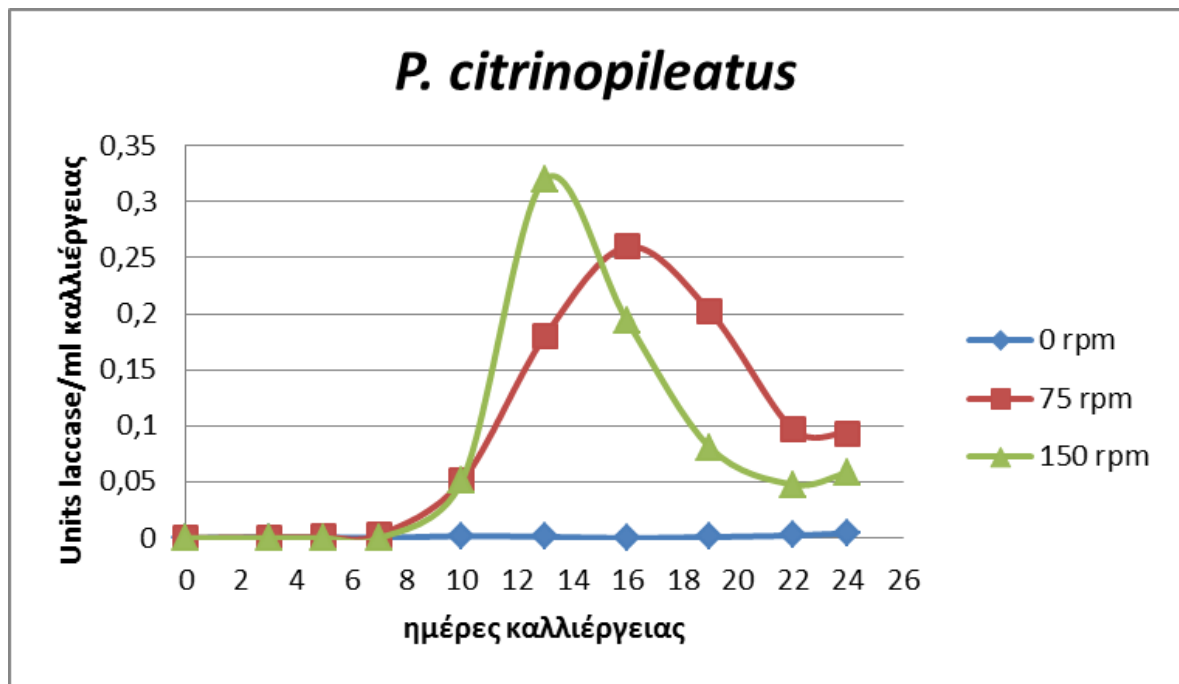
Η καλλιέργεια του κάθε στελέχους γίνεται στο βέλτιστο pH που προσδιορίστηκε στο πείραμα Α και φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Στέλεχος	pH
PCi	6
IL	6
GL	7

Πίνακας 4.5: Βέλτιστο pH καλλιέργειας για καθένα από τα υπό μελέτη στελέχη

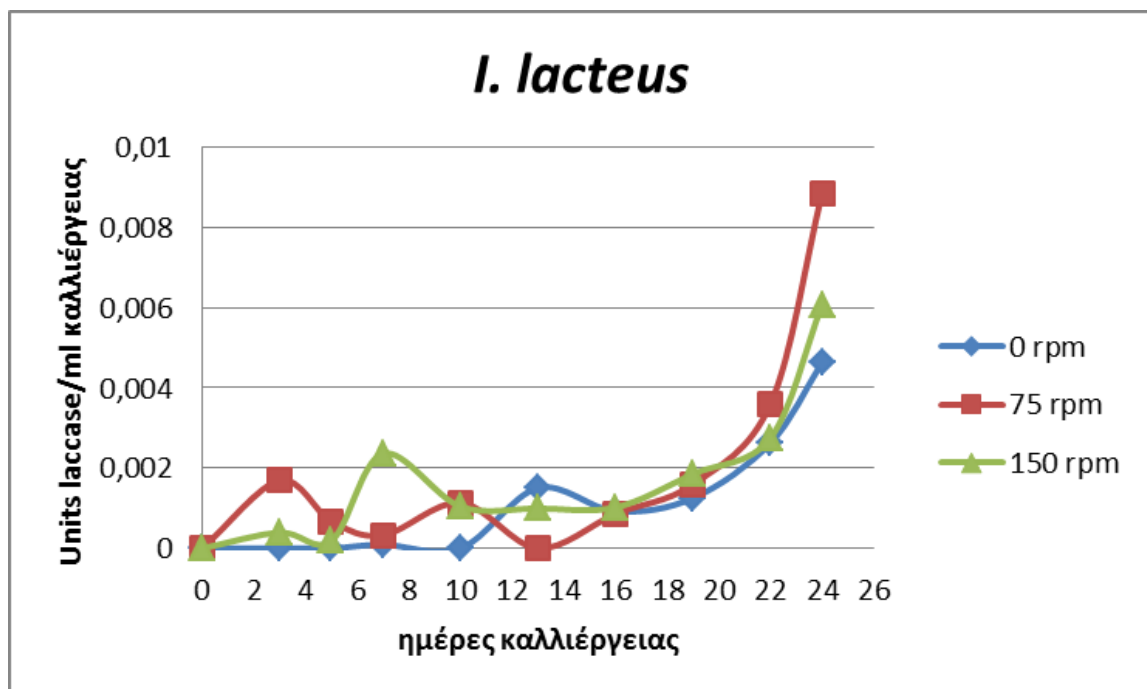
4.3.2. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η μεταβολή της ενεργότητας της λακκάσης σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας του κάθε στελέχους.



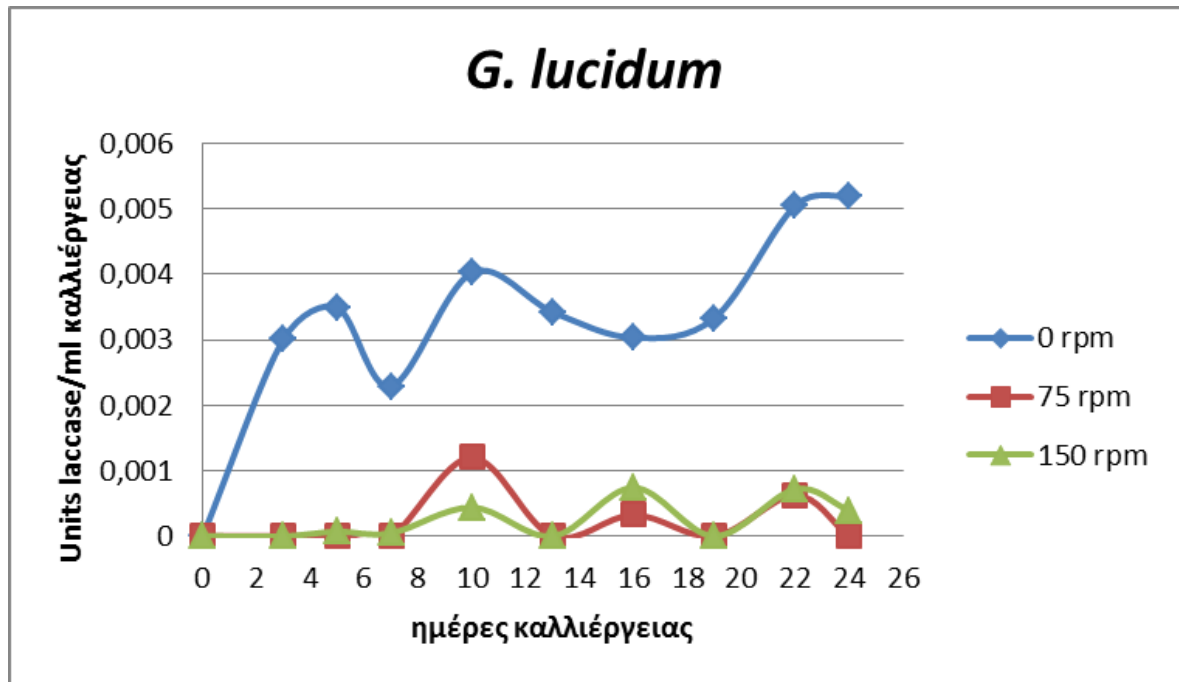
Διάγραμμα 4.6: Ενεργότητα λακκάσης (στέλεχος *P. citrinopileatus*)

Το στέλεχος *P. citrinopileatus* παρουσίασε ιδιαίτερα υψηλή ενεργότητα λακκάσης στα 150 αλλά και στα 75 rpm. Αντίθετα, απουσία ανάδευσης το στέλεχος δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί ικανοποιητικά ώστε να παράγει το ένζυμο.



Διάγραμμα 4.7: Ενεργότητα λακκάσης (στέλεχος *I. lacteus*)

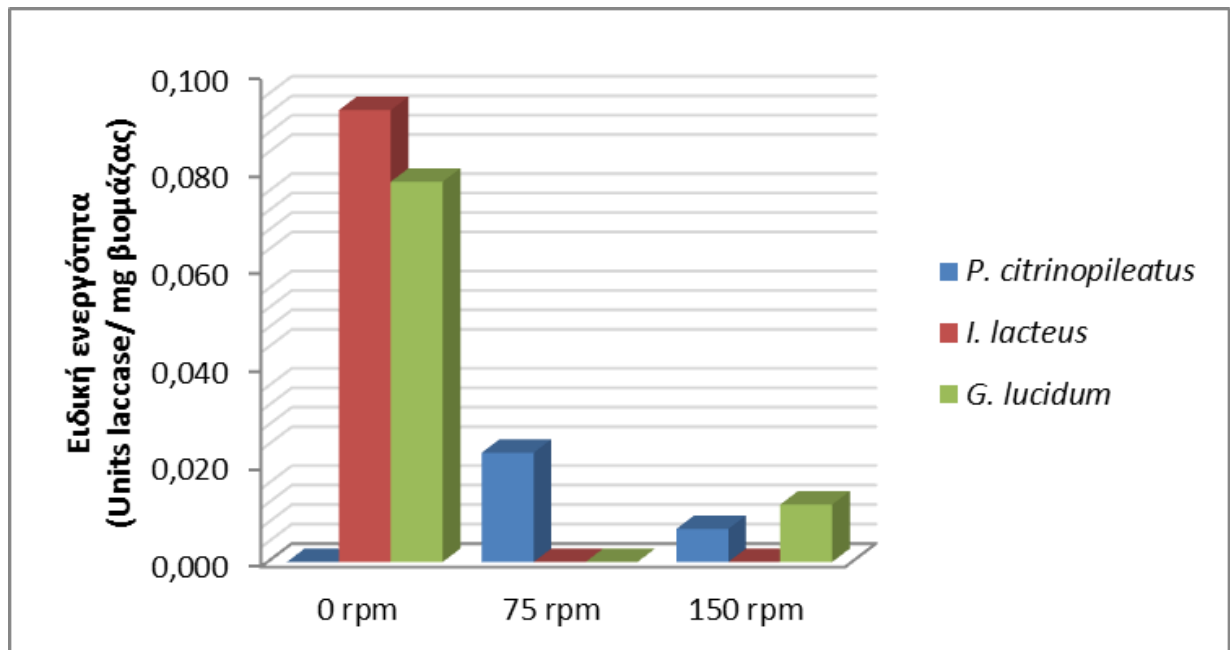
Σε ότι αφορά το στέλεχος *I. lacteus*, παρατηρήθηκε μία προτίμηση σε ανάδευση 75 rpm, χωρίς βεβαίως η ενεργότητα της λακκάσης στη συγκεκριμένη συνθήκη να είναι ιδιαίτερα υψηλότερη από τις άλλες συνθήκες.



Διάγραμμα 4.8: Ενεργότητα λακκάσης (στέλεχος *G. lucidum*)

Τέλος, στο στέλεχος *G. lucidum* παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου όταν καλλιεργήθηκε χωρίς ανάδευση.

Στο διάγραμμα και τον πίνακα που ακολουθούν παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα των τριών στελεχών στο τέλος της καλλιέργειας τους. Η ειδική ενζυμική ενεργότητα ορίζεται ως η ενζυμική ενεργότητα (U) ανά mg ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 4.9 : Ειδική ενζυμική ενεργότητα λακκάσης

Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
0 rpm	0,000	0,093	0,078
75 rpm	0,022	0,000	0,000
150 rpm	0,007	0,000	0,012

Πίνακας 4.6 : Ειδική ενζυμική ενεργότητα λακκάσης ($U\ mg^{-1}$)

4.3.3. Μετρήσεις βιομάζας

Στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζεται η παραχθείσα βιομάζα από κάθε καλλιέργεια. Το βάρος της βιομάζας εκφράζεται σε $mg\ ml^{-1}$ καλλιέργειας.

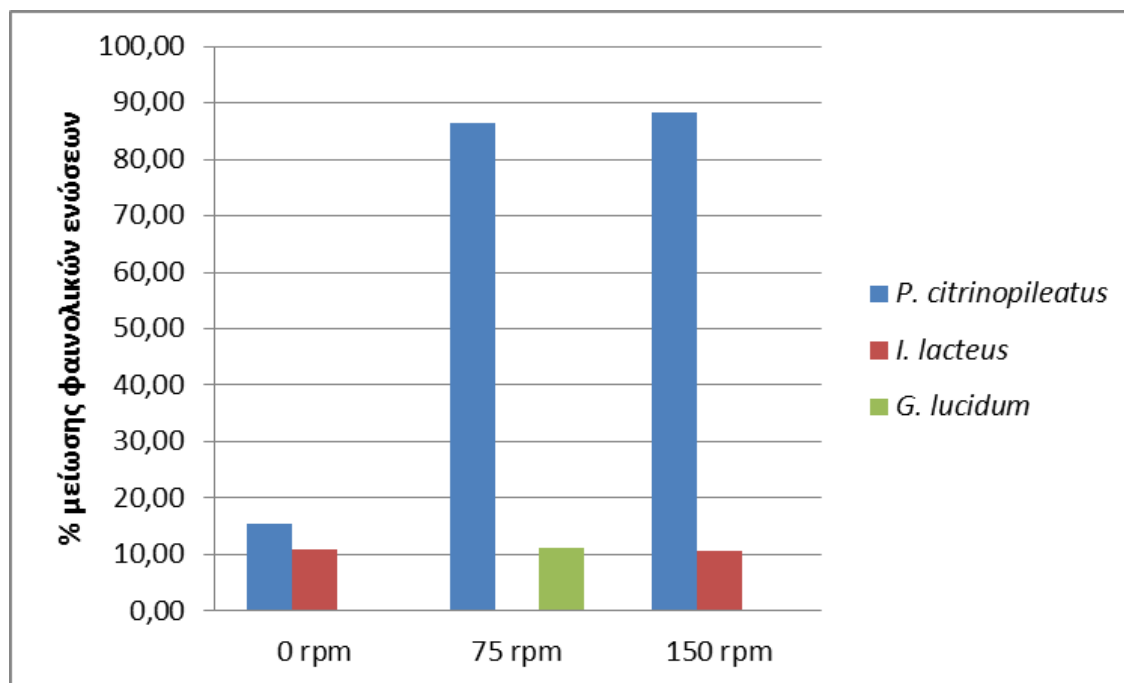
Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
0 rpm	0,000	0,050	0,067
75rpm	4,167	0,000	0,000
150rpm	8,567	0,000	0,033

Πίνακας 4.7: Βιομάζα στο τέλος της καλλιέργειας ($mg\ ml^{-1}$)

Το *P. citrinopileatus* παρήγαγε περισσότερη βιομάζα στη συνθήκη των 150 rpm, στην οποία είχε και την υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης. Το ίδιο ισχύει και για το στέλεχος *G. lucidum* και τη στατική καλλιέργεια. Όσον αφορά το *I. lacteus*, η καλλιέργεια έδωσε μικρή ποσότητα βιομάζας μόνο στη συνθήκη χωρίς ανάδευση.

4.3.4. Μέτρηση φαινολικών ενώσεων

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων για κάθε στέλεχος στο τέλος της καλλιέργειας του.



Διάγραμμα 4.10: % μείωσης φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις μειώνονται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 85% όταν το στέλεχος *P. citrinopileatus* καλλιεργείται υπό ανάδευση 75 και 150 rpm. Στην περίπτωση του στελέχους *I. lacteus*, οι φαινολικές ενώσεις μειώνονται κατά 10% στην στατική καλλιέργεια και υπό ανάδευση 150 rpm. Το στέλεχος *G. lucidum* επιτυγχάνει διάσπαση των φαινολικών ενώσεων κατά 10% στην καλλιέργεια υπό ανάδευση 75 rpm.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται συγκεντρωτικά το ποσοστό διάσπασης των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου από τα 3 στελέχη. Η μέγιστη αποικοδόμηση των φαινολών επιτεύχθηκε από το μύκητα *P. citrinopileatus* όταν αυτός καλλιεργήθηκε υπό ανάδευση.

Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
0 rpm	15,37	10,89	0,00
75rpm	86,47	0,00	11,22
150rpm	88,26	10,63	0,00

Πίνακας 4.8: Διάσπαση φαινολικών ενώσεων (%)

4.3.5. Αποχρωματισμός αποβλήτου

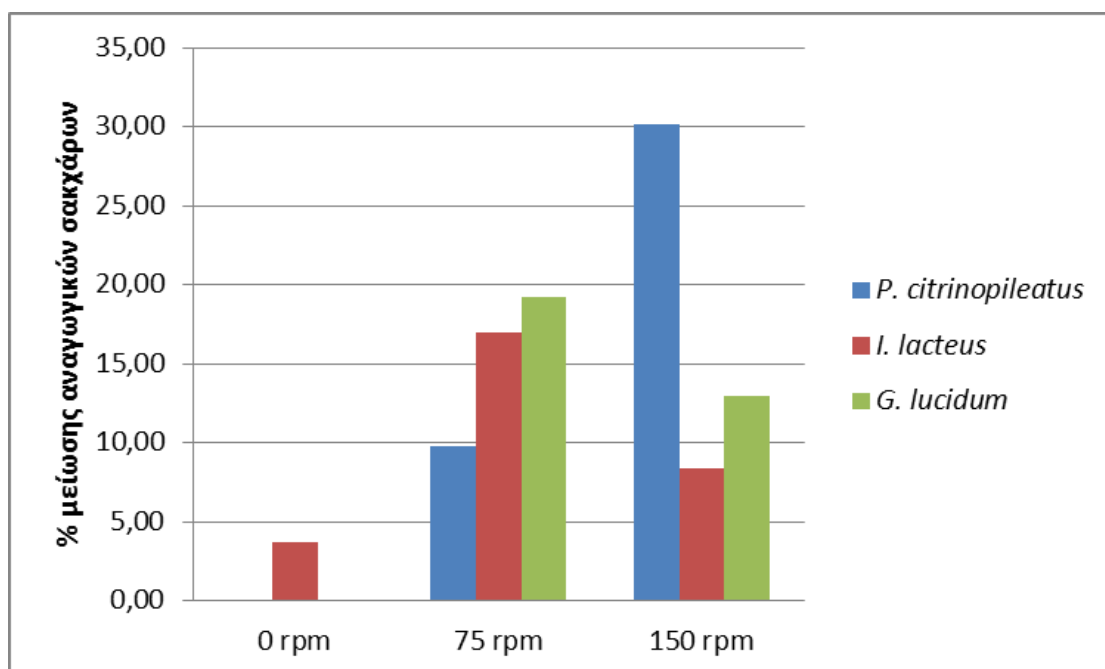
Στον Πίνακα 4.9 παρουσιάζεται το ποσοστό αποχρωματισμού του αποβλήτου για το κάθε στέλεχος. Το στέλεχος *P. citrinopileatus* κατάφερε σε μεγάλο βαθμό να αποχρωματίσει το απόβλητο όταν καλλιεργήθηκε υπό ανάδευση 75 και 150 rpm. Αντίθετα, στις καλλιέργειες των υπόλοιπων στελεχών δεν παρατηρήθηκε αποχρωματισμός του αποβλήτου.

Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
0 rpm	0	0	0
75rpm	49,87	0	2,02
150rpm	73,55	0	0

Πίνακας 4.9: Αποχρωματισμός αποβλήτου (%)

4.3.6. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου, όπως εξάλλου και ο ίδιος ο ελαιοκαρπός, είναι πλούσια σε σάκχαρα. Τα σάκχαρα, σε αντίθεση με τις φαινολικές ενώσεις, είναι πιο εύκολο να χρησιμοποιηθούν ως πηγή ενέργειας από τους μικροοργανισμούς. Θεωρείται, λοιπόν, ότι η αύξηση της βιομάζας των μικροοργανισμών οφείλεται σε πρώτο στάδιο στην κατανάλωση των σακχάρων και σε δεύτερο στάδιο στη διάσπαση των φαινολών. Τα αναγωγικά σάκχαρα ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο του DNS.



Διάγραμμα 4.11: % μείωσης συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων

Το στέλεχος *P. citrinopileatus* παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση των αναγωγικών σακχάρων όταν καλλιεργήθηκε υπό ανάδευση 150 rpm. Αντίστοιχα, το στέλεχος *I. lacteus* παρουσίασε μικρή μείωση των αναγωγικών σακχάρων σε όλες τις συνθήκες ανάδευσης, με μεγαλύτερη τη συνθήκη των 75 rpm ενώ το στέλεχος *G. lucidum* μόνο όταν καλλιεργήθηκε υπό ανάδευση.

Στον Πίνακα 4.10 φαίνεται συγκεντρωτικά το ποσοστό μείωσης των αναγωγικών σακχάρων στο τέλος της κάθε καλλιέργειας.

Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
0 rpm	0,00	3,72	0,00
75rpm	9,78	16,99	19,25
150rpm	30,12	8,38	13,01

Πίνακας 4.10: Μείωση σακχάρων (%)

4.4.Πείραμα Γ. Εύρεση βέλτιστης πηγής αζώτου

4.4.1. Εισαγωγή

Σκοπός του πειράματος είναι η μελέτη της επίδρασης διάφορων πηγών αζώτου στην ανάπτυξη και τη λιγνινολυτική δραστηριότητα των μικροοργανισμών. Για το σκοπό αυτό εξετάζονται οι ακόλουθες 5 πηγές αζώτου:

6. Τρυγικό διαμμώνιο ($C_4H_{12}N_2O_6$)
7. Νιτρικό κάλιο (KNO_3)
8. Νιτρικό αμμώνιο (NH_4NO_3)
9. Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)
10. Corn steep liquor

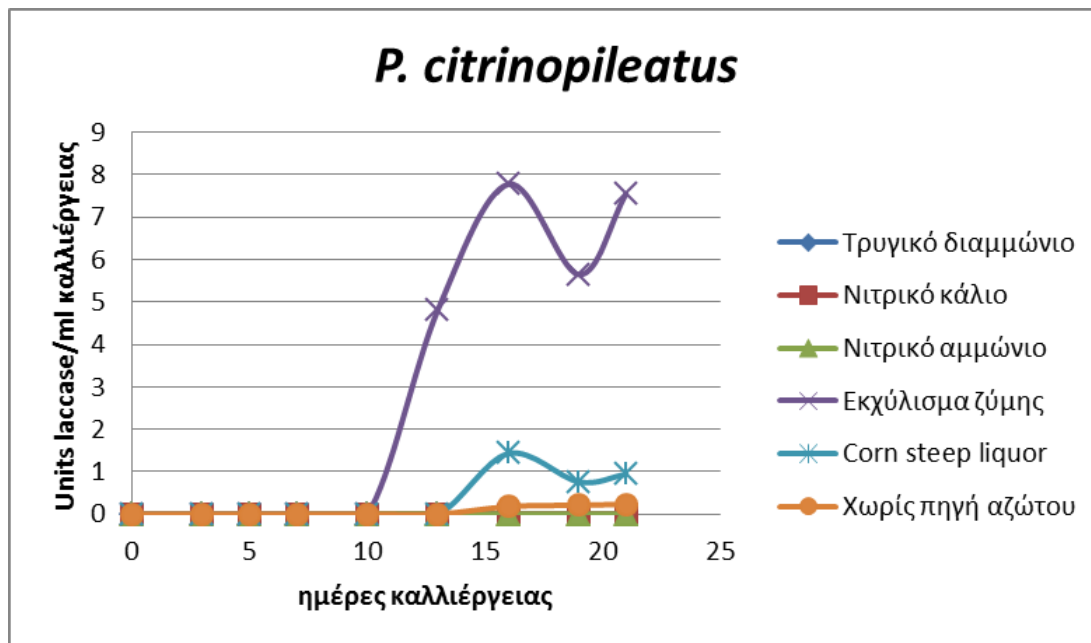
Οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται στις βέλτιστες συνθήκες pH και ρυθμού ανάδευσης που προσδιορίστηκαν στα προηγούμενα πειράματα και είναι οι εξής:

Στέλεχος	pH	rpm
<i>P. citrinopileatus</i>	6	150
<i>I.lacteus</i>	6	150
<i>G. lucidum</i>	7	150

Πίνακας 4.11: Βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας για καθένα από τα υπό μελέτη στελέχη

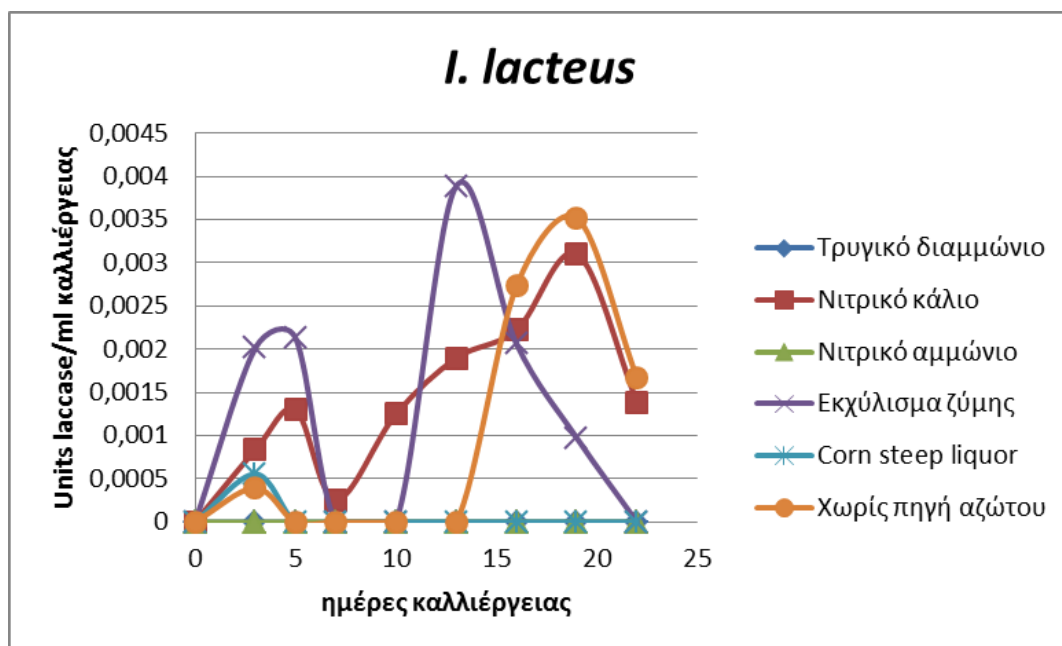
4.4.2. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η μεταβολή της ενεργότητας της λακκάσης σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας του κάθε στελέχους.



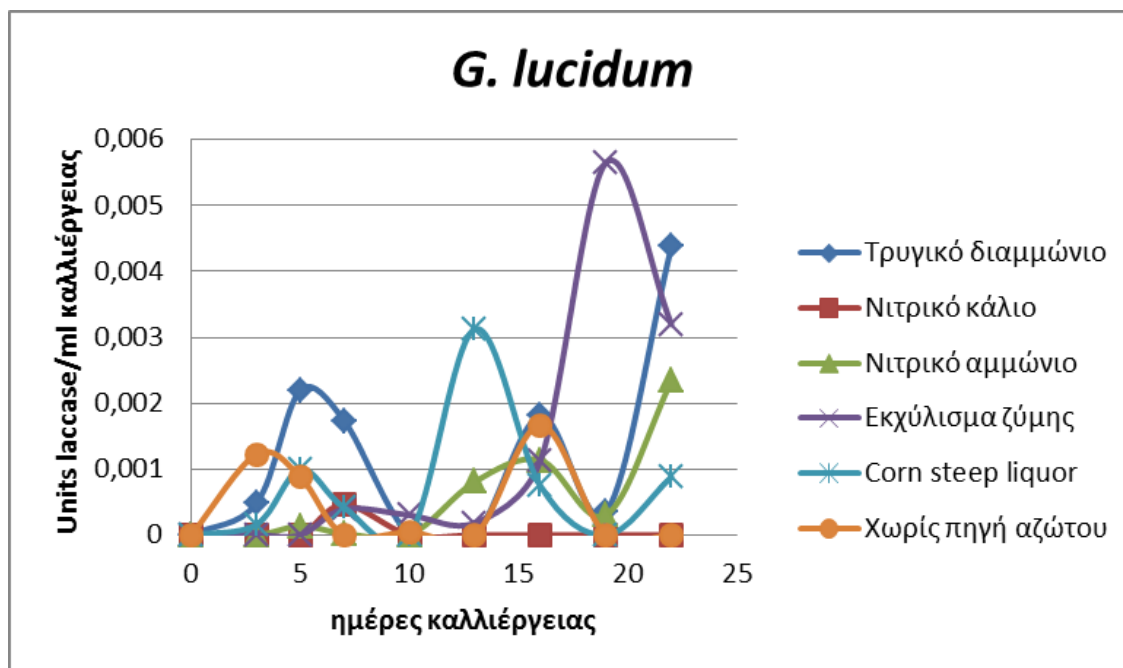
Διάγραμμα 4.12: Ενεργότητα λακκάσης (στέλεχος *P. citrinopileatus*)

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται φανερή η προτίμηση του στελέχους *P. citrinopileatus* στο εκχύλισμα ζύμης. Επίσης υψηλή ενεργότητα λακκάσης προέκυψε και όταν η καλλιέργεια εμπλουτίστηκε με corn steep ως πηγή αζώτου. Στις υπόλοιπες πηγές αζώτου δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη παραγωγή ενζύμου.



Διάγραμμα 4.13: Ενεργότητα λακκάσης (στέλεχος *I. lacteus*)

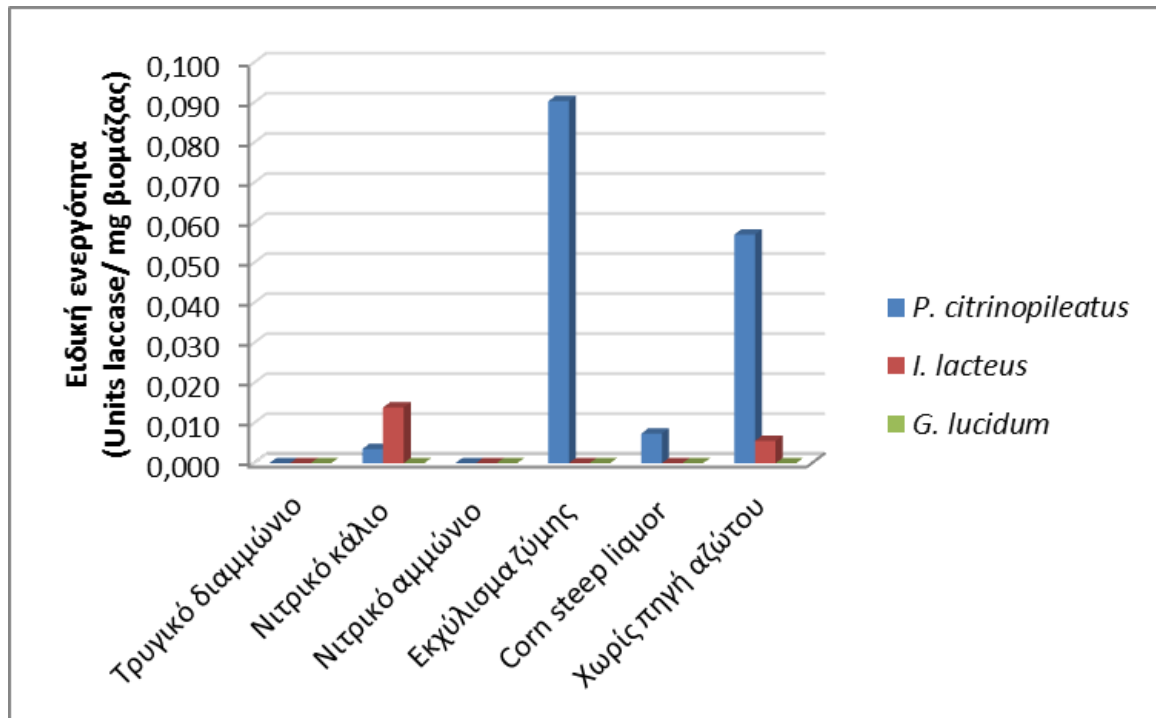
Στις καλλιέργειες του στελέχους *I. lacteus* με προσθήκη πηγής αζώτου νιτρικό κάλιο, εκχύλισμα ζύμης ή χωρίς προσθήκη αζώτου παρατηρήθηκε ενζυμική ενεργότητα λακκάσης. Ωστόσο, και στις τρεις αυτές περιπτώσεις η ενεργότητα που εντοπίστηκε ήταν πάρα πολύ μικρή και σε καμία περίπτωση συγκρίσιμη με του στελέχους *P. citrinopileatus*.



Διάγραμμα 4.14: Ενεργότητα λακκάσης (στέλεχος *G. lucidum*)

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι το στέλεχος *G. lucidum* παρουσίασε μικρή ενεργότητα λακκάσης μόνο όταν καλλιεργήθηκε με πηγή αζώτου τρυγικό διαμμώνιο και εκχύλισμα ζύμης.

Στο διάγραμμα και τον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα των τριών στελεχών στο τέλος της καλλιέργειας. Η ειδική ενζυμική ενεργότητα ορίζεται ως η ενζυμική ενεργότητα (U) ανά mg ξηρής βιομάζας. Το στέλεχος *P. citrinopileatus* παρουσιάζει υψηλότερη ειδική ενζυμική ενεργότητα λακκάσης όταν καλλιεργείται με προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης. Η ειδική ενεργότητα στην περίπτωση αυτή φτάνει τα $0,09 \text{ U mg}^{-1}$.



Διάγραμμα 4.15: Ειδική ενζυμική ενεργότητα

Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
Τρυγικό διαμμώνιο	0,000	0,000	0,000
Νιτρικό κάλιο	0,004	0,014	0,000
Νιτρικό αμμώνιο	0,000	0,000	0,000
Εκχύλισμα ζύμης	0,090	0,000	0,000
Corn steep liquor	0,007	0,000	0,000
Χωρίς πηγή αζώτου	0,057	0,006	0,000

Πίνακας 4.12: Ειδική ενζυμική ενεργότητα (U mg⁻¹)

4.4.3. Μετρήσεις βιομάζας

Στον Πίνακα 4.13 παρουσιάζεται η παραχθείσα βιομάζα από κάθε καλλιέργεια. Το βάρος της βιομάζας εκφράζεται σε mg ml⁻¹ καλλιέργειας.

Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
Τρυγικό διαμμώνιο	0,250	49,533	0,000
Νιτρικό κάλιο	0,317	0,100	0,000
Νιτρικό αμμώνιο	0,000	40,167	0,000
Εκχύλισμα ζύμης	83,517	54,667	0,000
Corn steep liquor	127,200	77,300	0,000
Χωρίς πηγή αζώτου	4,067	0,300	0,400

Πίνακας 4.13: Βιομάζα στο τέλος της καλλιέργειας (mg ml^{-1})

Το στέλεχος *P. citrinopileatus* αναπτύχθηκε περισσότερο όταν καλλιεργήθηκε με πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης και corn steep. Στην περίπτωση του στελέχους *I. lacteus* παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση με την προσθήκη τρυγικού διαμμωνίου, εκχυλίσματος ζύμης και corn steep. Τέλος, το στέλεχος *G. lucidum* δεν αναπτύχθηκε σε καμία συνθήκη.

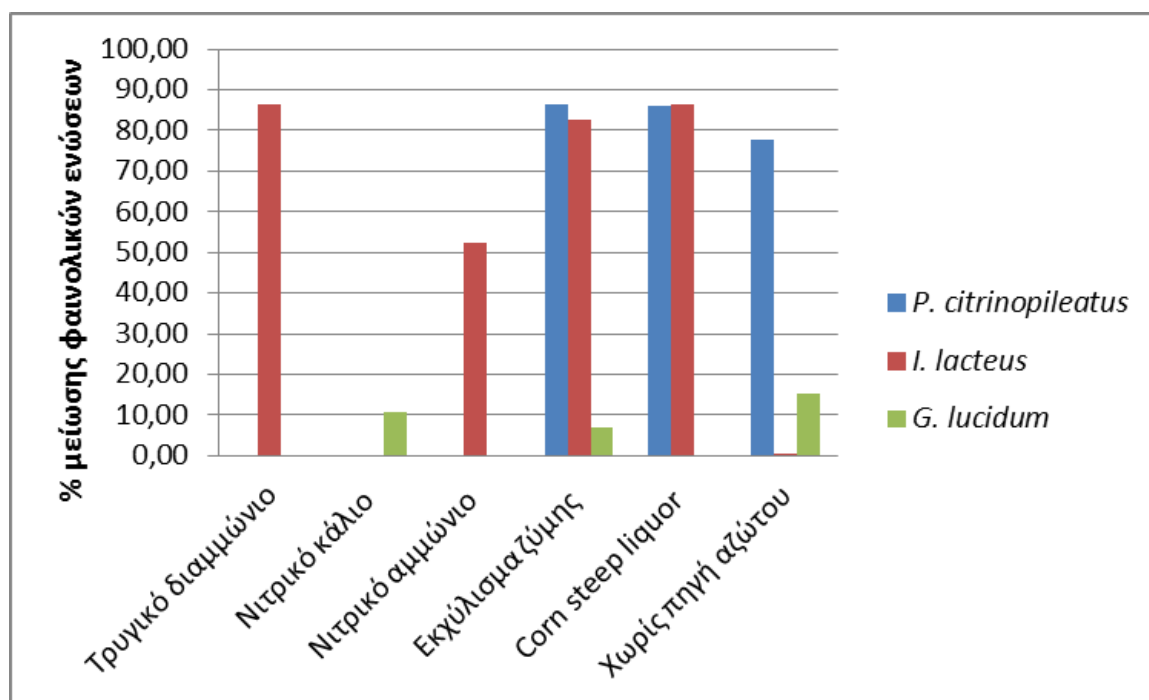
Στην Εικόνα 4.3 φαίνεται η βιομάζα που προέκυψε ύστερα από την καλλιέργεια του στελέχους *P. citrinopileatus* με πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης και το corn steep, καθώς σε αυτές τις συνθήκες προέκυψε η μέγιστη βιομάζα.



Εικόνα 4.3: Βιομάζα (στέλεχος *P. citrinopileatus*)

4.4.4. Μέτρηση φαινολικών ενώσεων

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων για κάθε στέλεχος στο τέλος της καλλιέργειας του.



Διάγραμμα 4.16: % μείωσης φαινολικών ενώσεων

Το στέλεχος *P.citrinopileatus* επιτυγχάνει διάσπαση φαινολικών ενώσεων σε ποσοστό 80% σε καλλιέργειες χωρίς πηγή αζώτου ή όταν χρησιμοποιείται το εκχύλισμα ζύμης και το corn steep ως πηγή αζώτου. Στις άλλες περιπτώσεις δεν παρατηρείται μεταβολή της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου. Το στέλεχος *I.lacteus* επιτυγχάνει αποτελεσματική διάσπαση των φαινολικών ενώσεων σε καλλιέργειες με προσθήκη των εξής πηγών αζώτου: τρυγικό διαμμώνιο, νιτρικό αμμώνιο, εκχύλισμα ζύμης και corn steep liquor. Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι το στέλεχος *G.lucidum* δεν επιτυγχάνει ικανοποιητική αποδόμηση φαινολικών ενώσεων σε καμία συνθήκη καλλιέργειας.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται συγκεντρωτικά το ποσοστό διάσπασης των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου από τα 3 στελέχη.

Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
Τρυγικό διαμμώνιο	0,00	86,27	0,00
Νιτρικό κάλιο	0,00	0,00	10,71
Νιτρικό αμμώνιο	0,00	52,29	0,00
Εκχύλισμα ζύμης	86,43	82,52	6,85
Corn steep liquor	86,06	86,37	0,00
Χωρίς πηγή αζώτου	77,54	0,59	15,31

Πίνακας 4.14: Διάσπαση φαινολικών ενώσεων (%)

4.4.5. Αποχρωματισμός αποβλήτου

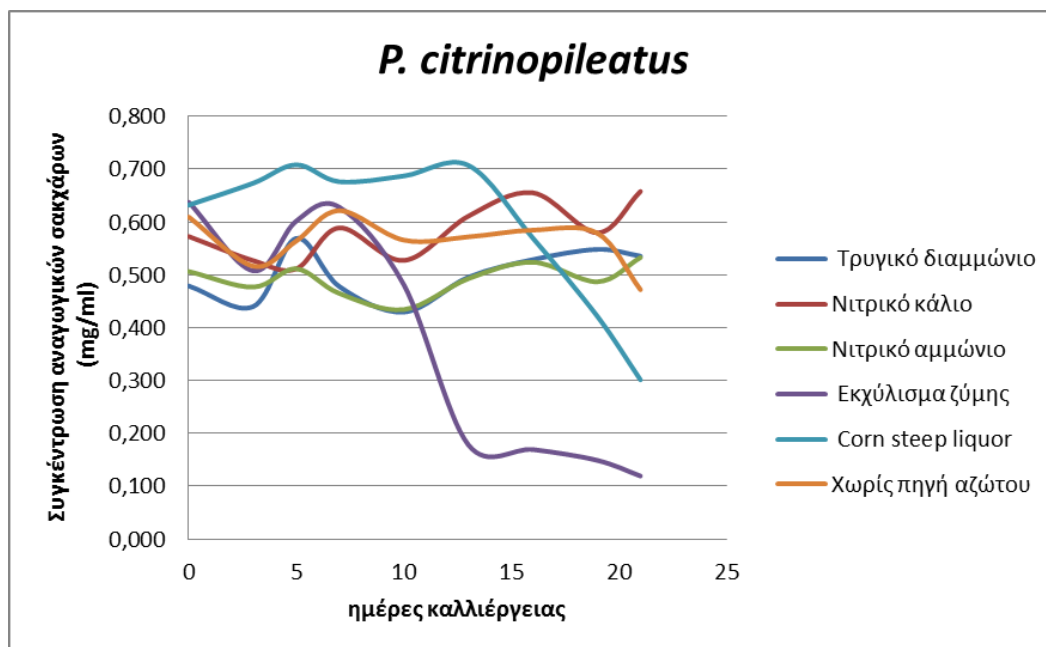
Στον Πίνακα 4.15 παρουσιάζεται το ποσοστό αποχρωματισμού του αποβλήτου για το κάθε στέλεχος. Τα στελέχη *P.citrinopileatus* και *I.lacteus* επιτυγχάνουν αποχρωματισμό σε ποσοστό 80% όταν καλλιεργούνται με πηγή αζώτου το corn steep. Εξίσου μεγάλο αποχρωματισμό (75%) επιφέρει το στέλεχος *I.lacteus* όταν καλλιεργείται με προσθήκη τρυγικού διαμμωνίου ως πηγή αζώτου. Το στέλεχος *G.lucidum* δεν επιτυγχάνει καθόλου αποχρωματισμό στο απόβλητο.

Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
Τρυγικό διαμμώνιο	16,48	75,33	0,00
Νιτρικό κάλιο	0,00	0,00	9,36
Νιτρικό αμμώνιο	0,00	50,66	0,00
Εκχύλισμα ζύμης	28,45	49,20	0,00
Corn steep liquor	79,08	80,29	0,00
Χωρίς πηγή αζώτου	37,36	0,00	0,00

Πίνακας 4.15: Αποχρωματισμός αποβλήτου (%)

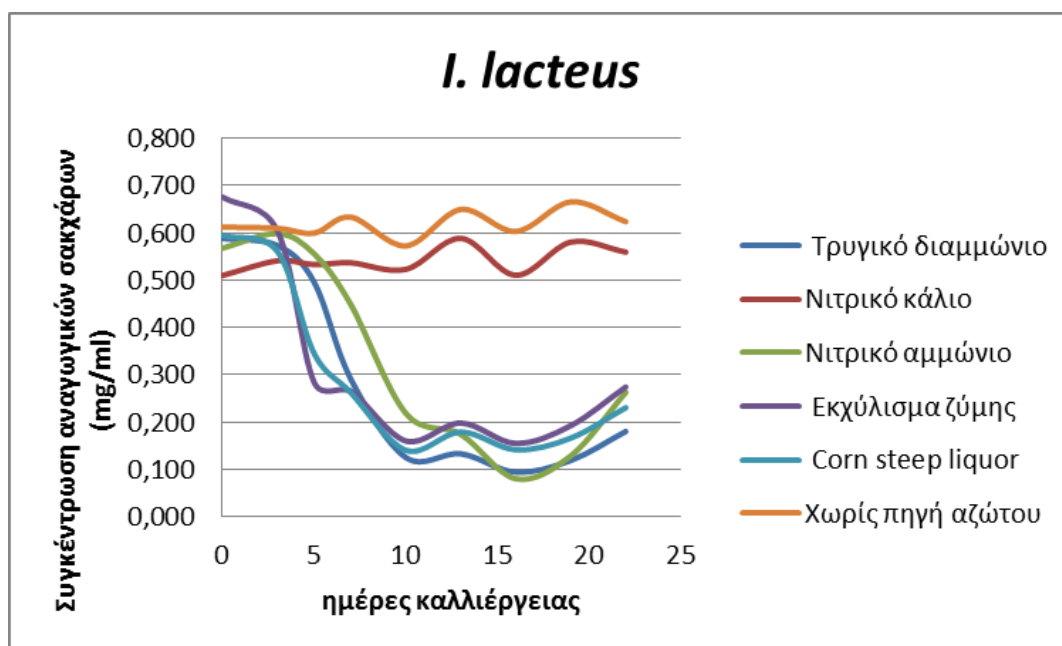
4.4.6. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων

Στα ακόλουθα διαγράμματα παρουσιάζεται η μείωση των αναγωγικών σακχάρων του αποβλήτου σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας.



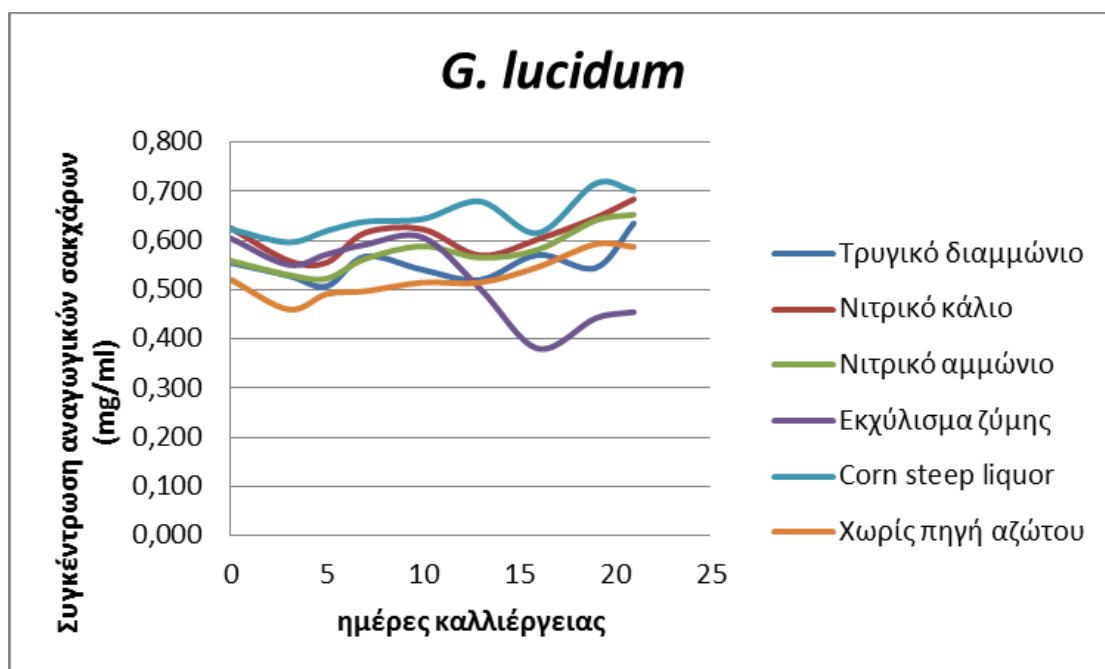
Διάγραμμα 4.17 Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων (στέλεχος *P. citrinopileatus*)

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται φανερή η μείωση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων όταν το στέλεχος *P. citrinopileatus* καλλιεργείται με την προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης ή corn steep ως πηγή αζώτου. Στις υπόλοιπες συνθήκες τα αναγωγικά σάκχαρα παραμένουν σταθερά.



Διάγραμμα 4.18: Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων (στέλεχος *I. lacteus*)

Στις καλλιέργειες του στελέχους *I. lacteus* με πηγή αζώτου τρυγικό διαμμώνιο, νιτρικό αμμώνιο, εκχύλισμα ζύμης και corn steep παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων.



Διάγραμμα 4.19: Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων (στέλεχος *G. lucidum*)

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, στις καλλιέργειες του στελέχους *G. lucidum* δεν παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων.

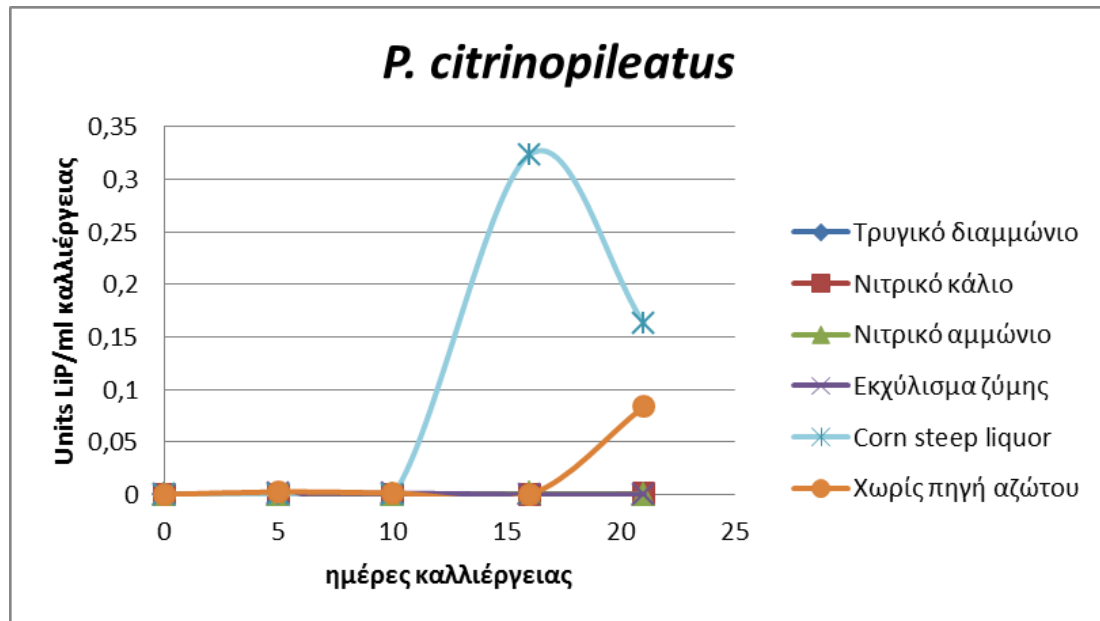
Στον Πίνακα 4.16 φαίνεται συγκεντρωτικά το ποσοστό μείωσης των αναγωγικών σακχάρων για το κάθε στέλεχος στο τέλος της καλλιέργειας.

Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
Τρυγικό διαμμώνιο	0	69,36	0
Νιτρικό κάλιο	0	0,00	0
Νιτρικό αμμώνιο	0	53,71	0
Εκχύλισμα ζύμης	81,27	59,39	24,78
Corn steep liquor	52,34	61,23	0
Χωρίς πηγή αζώτου	22,60	0,00	0

Πίνακας 4.16: Μείωση σακχάρων (%)

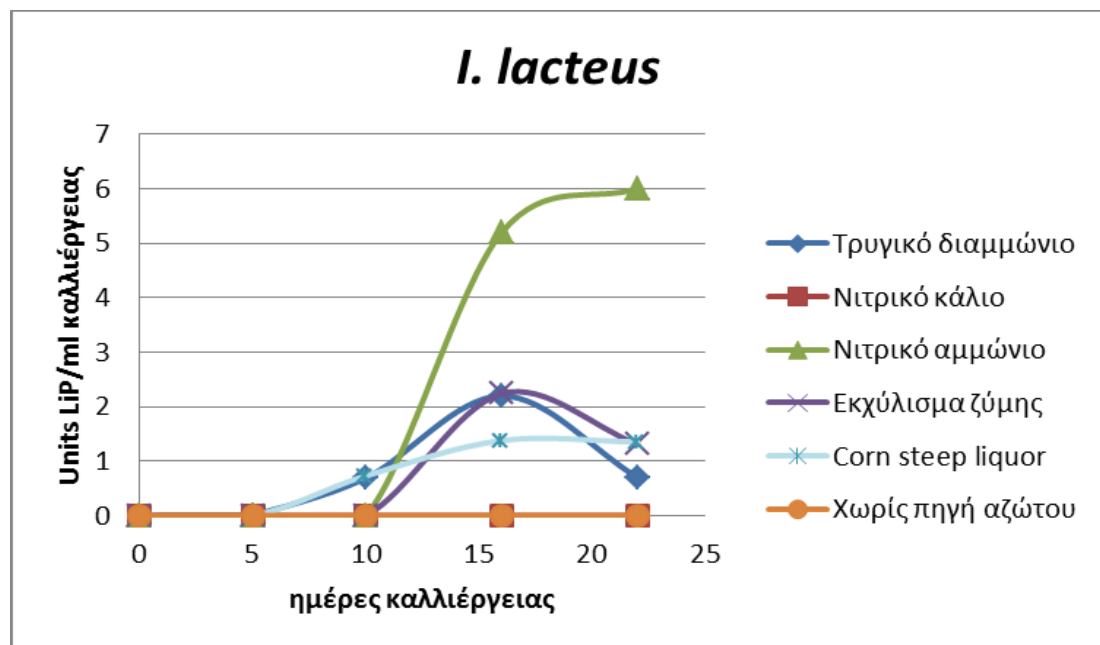
4.4.7. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης της λιγνίνης

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η μεταβολή της ενεργότητας της υπεροξειδάσης της λιγνίνης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του κάθε στελέχους.



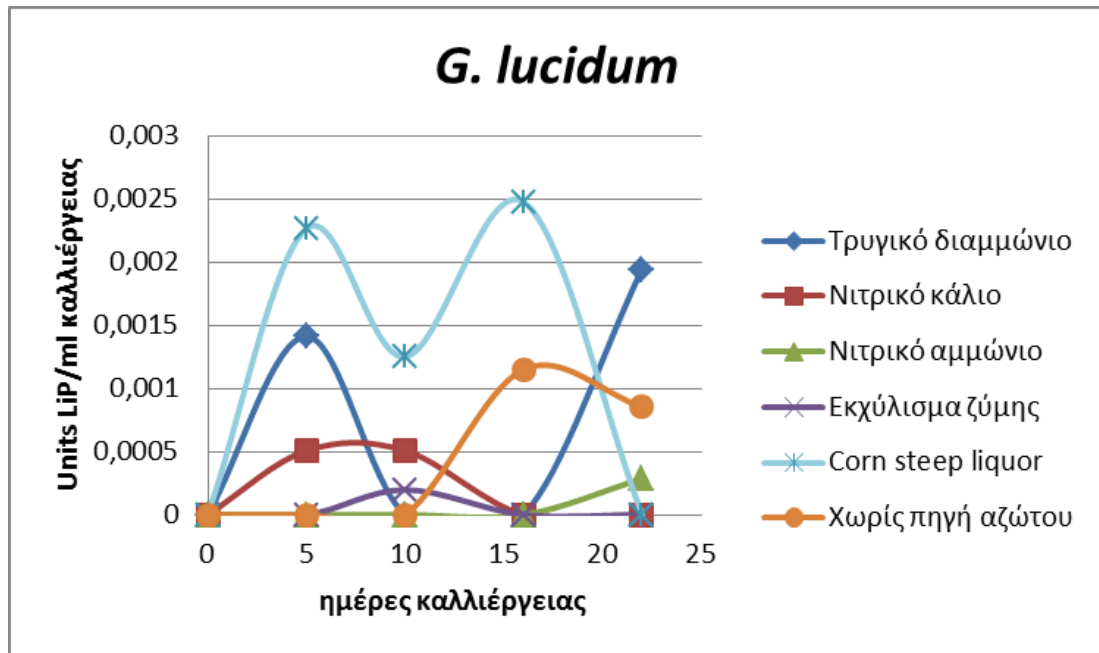
Διάγραμμα 4.20: Ενεργότητα υπεροξειδάσης της λιγνίνης (στέλεχος *P. citrinopileatus*)

Υψηλή ενεργότητα LiP παρουσιάστηκε όταν το στέλεχος *P. citrinopileatus* καλλιεργήθηκε με προσθήκη corn steep ως πηγή αζώτου.



Διάγραμμα 4.21: Ενεργότητα υπεροξειδάσης της λιγνίνης (στέλεχος *I. lacteus*)

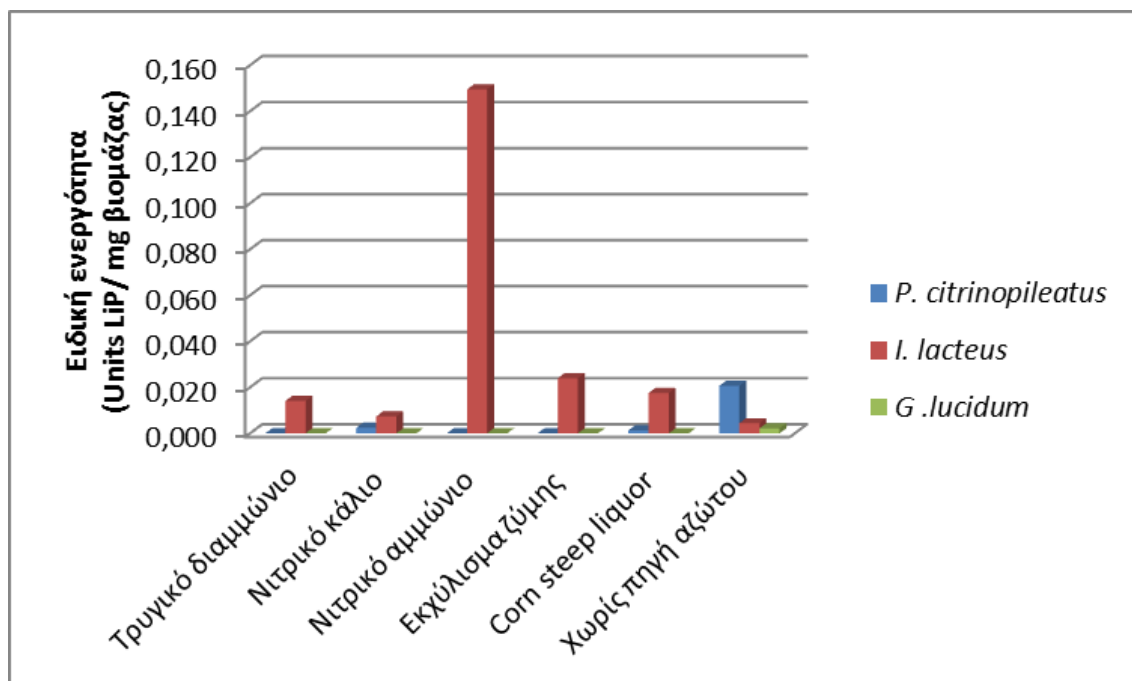
Το στέλεχος *I. lacteus* παρουσίασε πολύ υψηλή ενεργότητα LiP όταν καλλιεργήθηκε με την προσθήκη νιτρικού αμμωνίου ως πηγή αζώτου.



Διάγραμμα 4.22: Ενεργότητα υπεροξειδάσης της λιγνίνης (στέλεχος *G. lucidum*)

Το στέλεχος *G. lucidum*, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, δεν κατάφερε να αναπτυχθεί και επομένως να παράγει λιγνινολυτικά ένζυμα σε ικανοποιητικό βαθμό.

Στο διάγραμμα και τον πίνακα που ακολουθούν παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα του ενζύμου LiP για τα τρία στελέχη στο τέλος της καλλιέργειας τους. Η ειδική ενζυμική ενεργότητα ορίζεται ως η ενζυμική ενεργότητα (U) ανά mg ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 4.23: Ειδική ενζυμική ενεργότητα LiP

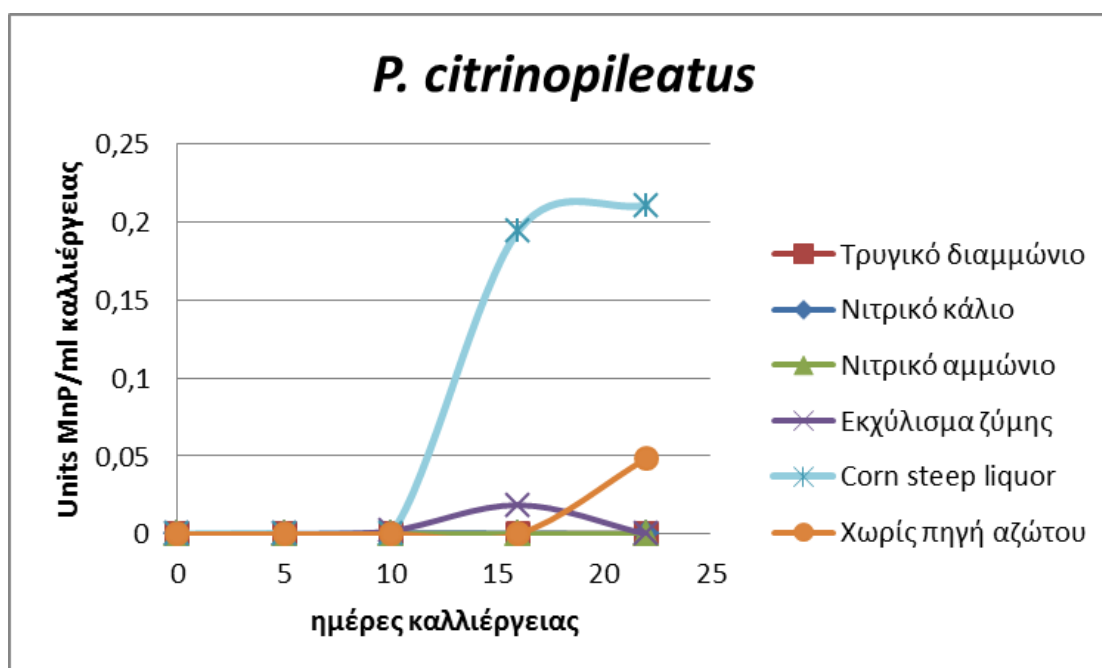
Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
Τρυγικό διαμμώνιο	0,000	0,014	0,000
Νιτρικό κάλιο	0,002	0,007	0,000
Νιτρικό αμμώνιο	0,000	0,149	0,000
Εκχύλισμα ζύμης	0,000	0,024	0,000
Corn steep liquor	0,001	0,017	0,000
Χωρίς πηγή αζώτου	0,021	0,004	0,002

Πίνακας 4.17: Ειδική ενζυμική ενεργότητα LiP ($U\ mg^{-1}$)

Υψηλότερη ειδική ενζυμική ενεργότητα υπεροξειδάσης της λιγνίνης ($0,149\ U\ mg^{-1}$) εμφανίζει το στέλεχος *I. lacteus* όταν καλλιεργείται με προσθήκη νιτρικού αμμωνίου.

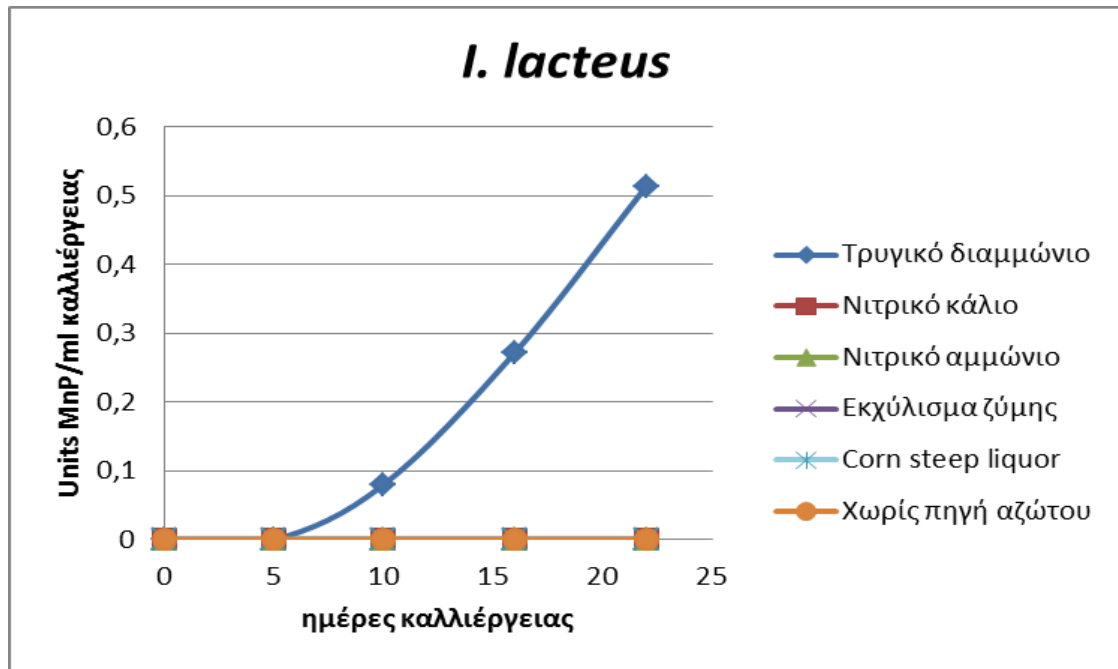
4.4.8. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης του μαγγανίου

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η μεταβολή της ενεργότητας της υπεροξειδάσης του μαγγανίου κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του κάθε στελέχους.



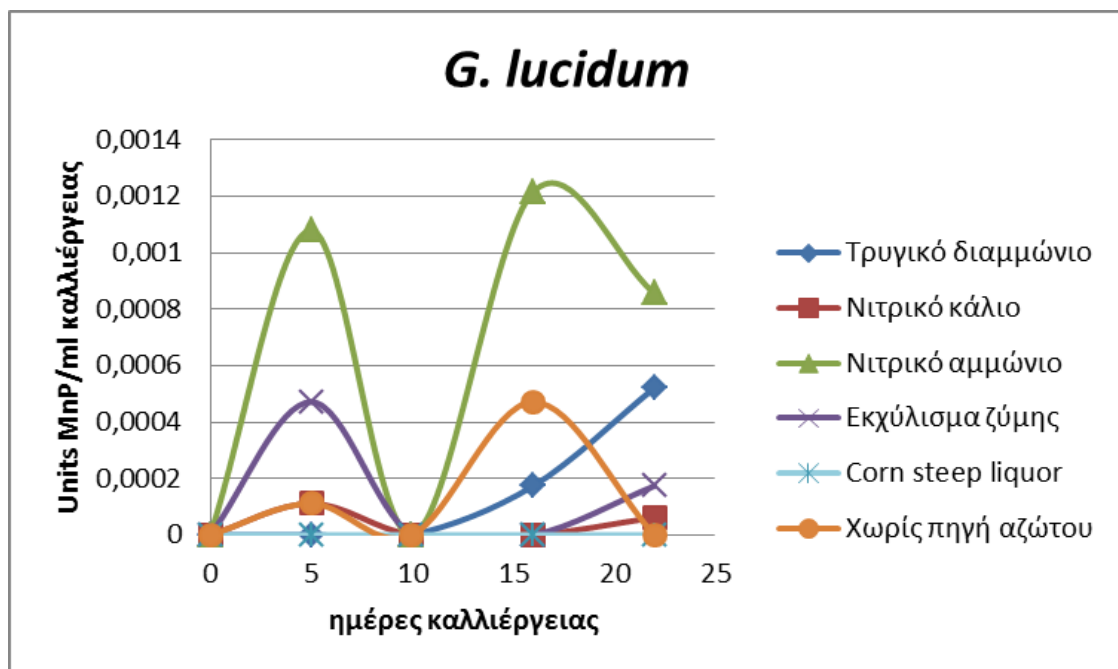
Διάγραμμα 4.24: Ενεργότητα υπεροξειδάσης του μαγγανίου (στέλεχος *P. citrinopileatus*)

Υψηλή ενεργότητα MnP παρουσιάστηκε όταν το στέλεχος *P. citrinopileatus* καλλιεργήθηκε με προσθήκη corn steep ως πηγή αζώτου.



Διάγραμμα 4.25: Ενεργότητα υπεροξειδάσης του μαγγανίου (στέλεχος *I. lacteus*)

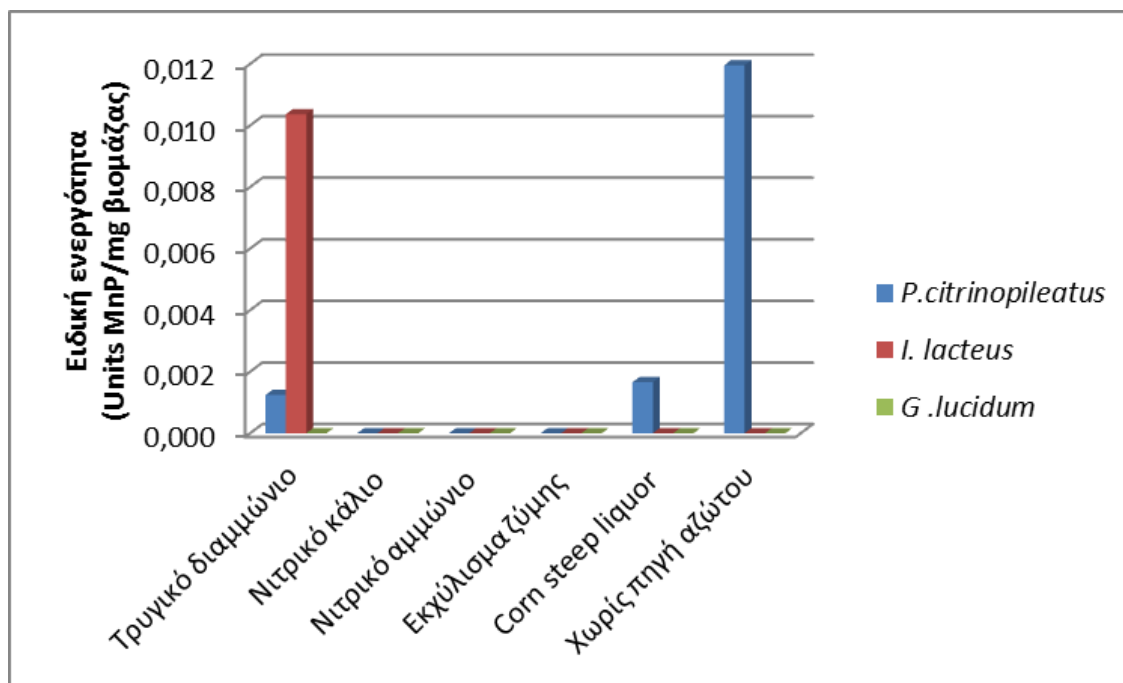
Αντίθετα με την περίπτωση της LiP, η υπεροξειδάση του μαγγανίου φαίνεται ότι εκφράζεται από το στέλεχος *I. lacteus* μόνο όταν αυτό καλλιεργείται με προσθήκη τρυγικού διαμμωνίου ως πηγή αζώτου.



Διάγραμμα 4.26: Ενεργότητα υπεροξειδάσης του μαγγανίου (στέλεχος *G. lucidum*)

Το στέλεχος *G. lucidum*, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, δεν κατάφερε να αναπτυχθεί και επομένως να παράγει λιγνινολυτικά ένζυμα σε ικανοποιητικό βαθμό.

Στο διάγραμμα και τον πίνακα που ακολουθούν παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα του ενζύμου MnP για τα τρία στελέχη στο τέλος της καλλιέργειάς τους. Η ειδική ενζυμική ενεργότητα ορίζεται ως η ενζυμική ενεργότητα (U) ανά mg ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 4.27: Ειδική ενζυμική ενεργότητα MnP

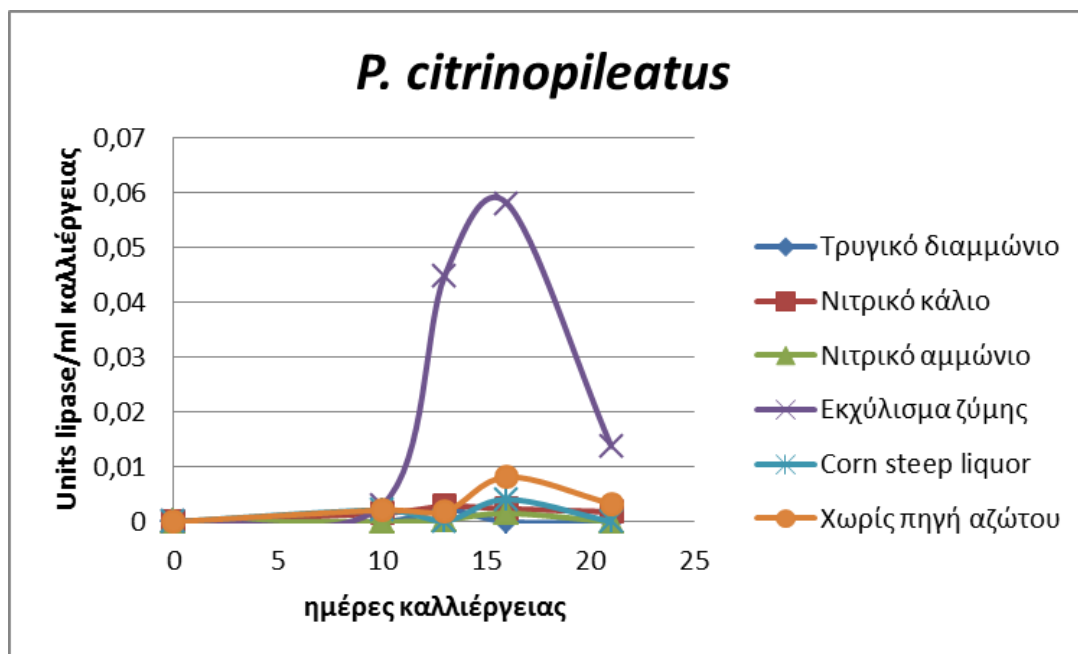
Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
Τρυγικό διαμμώνιο	0,001	0,010	0,000
Νιτρικό κάλιο	0,000	0,000	0,000
Νιτρικό αμμώνιο	0,000	0,000	0,000
Εκχύλισμα ζύμης	0,000	0,000	0,000
Corn steep liquor	0,002	0,000	0,000
Χωρίς πηγή αζώτου	0,012	0,000	0,000

Πίνακας 4.18: Ειδική ενζυμική ενεργότητα MnP (U mg⁻¹)

Υψηλότερη ειδική ενζυμική ενεργότητα υπεροξειδάσης του μαγγανίου (0,012 U mg⁻¹) εμφανίζει το στέλεχος *P. citrinopileatus* όταν καλλιεργείται χωρίς προσθήκη κάποιας πηγής αζώτου.

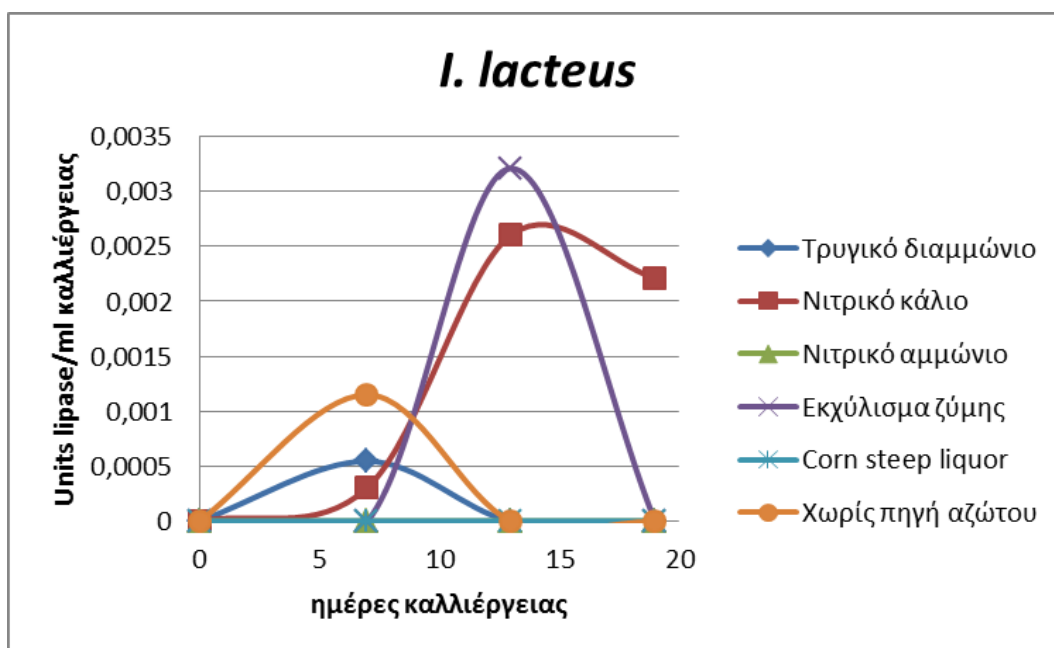
4.4.9. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας λιπάσης

Στα διαγράμματα 4.33, 4.34 και 4.35 παρουσιάζεται η μεταβολή της ενζυμικής ενεργότητας της λιπάσης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.



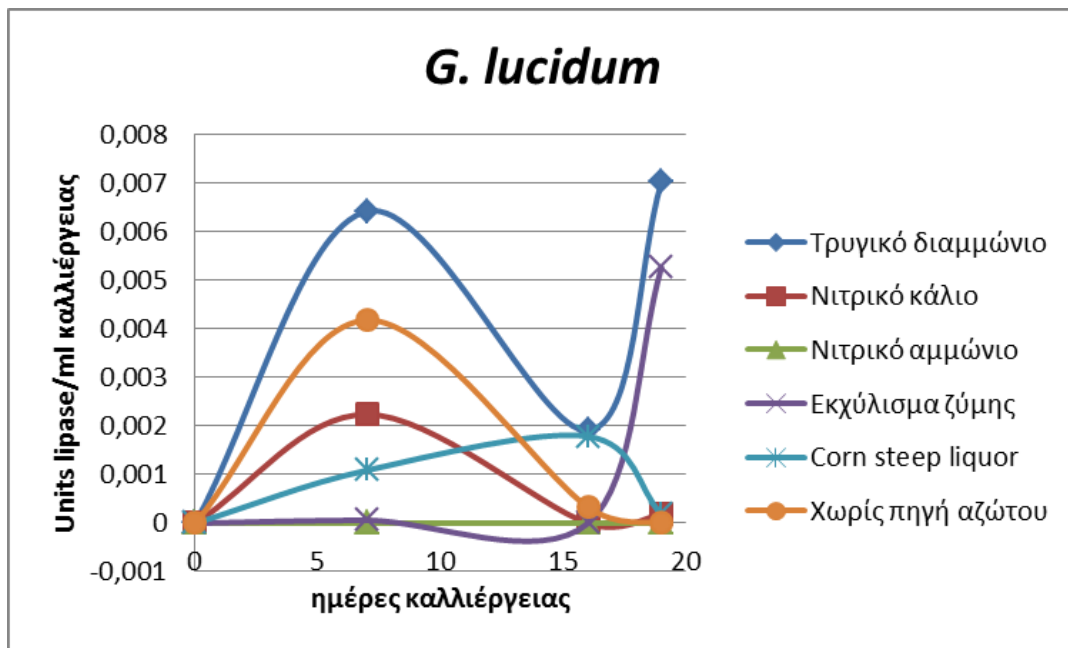
Διάγραμμα 4.28: Ενζυμική ενεργότητα λιπάσης (στέλεχος *P. citrinopileatus*)

Στις καλλιέργειες του στελέχους *P. citrinopileatus* με προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης παρατηρήθηκε ενζυμική ενεργότητα λιπάσης.



Διάγραμμα 4.29: Ενζυμική ενεργότητα λιπάσης (στέλεχος *I. lacteus*)

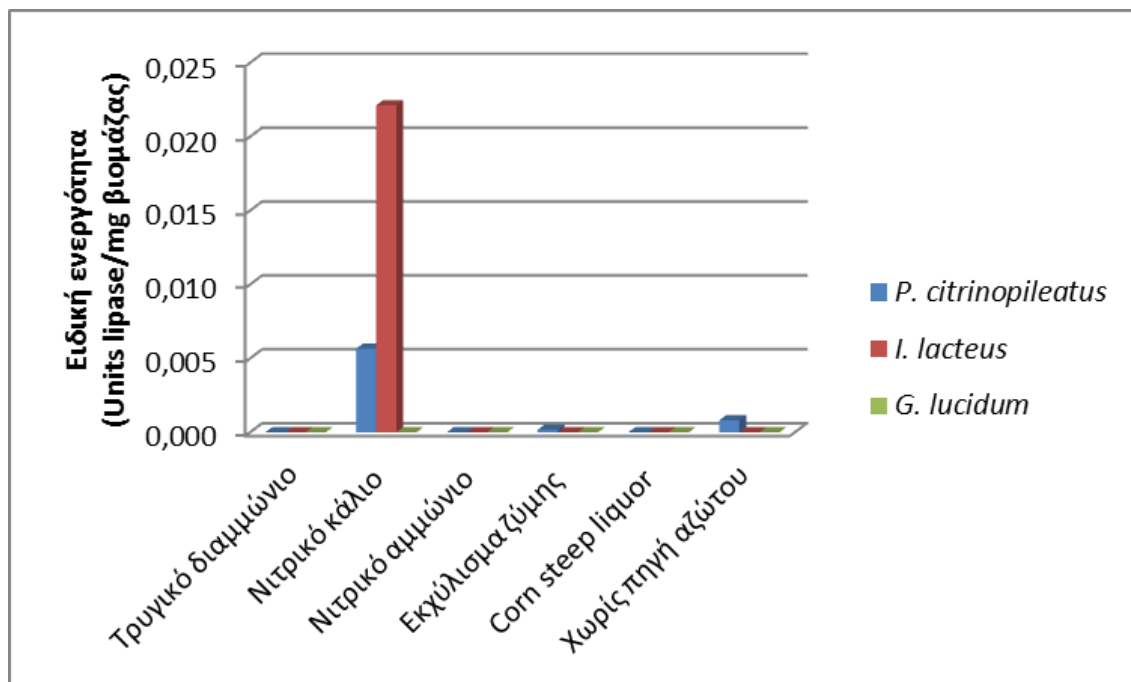
Το στέλεχος *I. lacteus* εκφράζει το ένζυμο της λιπάσης σε πολύ μικρό βαθμό.



Διάγραμμα 4.30: Ενζυμική ενεργότητα λιπάσης (στέλεχος *G. lucidum*)

Το στέλεχος *G. lucidum* όπως έχει προαναφερθεί δεν κατάφερε να αναπτυχθεί και επομένως να παράγει ένζυμα. Από τα τρία διαγράμματα προκύπτει ότι μεγαλύτερη παραγωγή λιπάσης προέκυψε από το στέλεχος *P. citrinopileatus*.

Στο διάγραμμα και τον πίνακα που ακολουθούν παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα της λιπάσης για τα τρία στελέχη στο τέλος της καλλιέργειας τους. Η ειδική ενζυμική ενεργότητα ορίζεται ως η ενζυμική ενεργότητα (U) ανά mg ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 4.31: Ειδική ενζυμική ενεργότητα λιπάσης

Δείγμα	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>G. lucidum</i>
Τρυγικό διαμμώνιο	0,000	0,000	0,000
Νιτρικό κάλιο	0,006	0,022	0,000
Νιτρικό αμμώνιο	0,000	0,000	0,000
Εκχύλισμα ζύμης	0,000	0,000	0,000
Corn steep liquor	0,000	0,000	0,000
Χωρίς πηγή αζώτου	0,001	0,000	0,000

Πίνακας 4.19: Ειδική ενζυμική ενεργότητα λιπάσης (U mg⁻¹)

Υψηλότερη ειδική ενζυμική ενεργότητα λιπάσης (0,022 U mg⁻¹) εμφανίζει το στέλεχος *I. lacteus* όταν καλλιεργείται με νιτρικό κάλιο.

4.4.10. Μέτρηση φαινολικών ενώσεων βιομάζας

Η συγκεκριμένη μέτρηση πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανότητας προσρόφησης των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου στη βιομάζα του μικροοργανισμού. Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν στην παραχθείσα βιομάζα στο τέλος της καλλιέργειας ήταν μόλις 30 ppm, όταν η μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου ήταν περίπου 1300 ppm. Επομένως, τα ΥΑΕ αποικοδομούνται χωρίς οι φαινολικές ενώσεις να προσροφούνται στην παραγόμενη βιομάζα.

Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα

5.1. Εισαγωγή

Η βιολογική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου με τη χρήση λιγνινολυτικών μυκήτων είναι μία νέα και πολλά υποσχόμενη μέθοδος για τη μείωση του ρυπαντικού φορτίου των αποβλήτων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα διπλωματική εργασία είναι πολύ ενθαρρυντικά για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου. Συνοπτικά αναφέρεται ότι δύο από τα τρία εξεταζόμενα στελέχη επέφεραν αποχρωματισμό του αποβλήτου μέχρι και 80%, ενώ μείωσαν τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο απόβλητο κατά 90%. Το τρίτο στέλεχος που μελετήθηκε, συγκεκριμένα ο βασιδιομύκητας *Ganoderma lucidum*, δεν κατάφερε να αναπτυχθεί ικανοποιητικά σε καμία συνθήκη καλλιέργειας από όσες μελετήθηκαν. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η λιγνινολυτική δράση των μυκήτων λευκής σήψης που μελετήθηκαν οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ενζυμική ενεργότητα λακκάσης στην περίπτωση του στελέχους *Pleurotus citrinopileatus*, ενώ το στέλεχος *Irpex lacteus* εκφράζει κυρίως υπεροξειδάσες. Ακολουθεί εκτενής συζήτηση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος ξεχωριστά.

5.2. Πείραμα Α: Εύρεση βέλτιστου pH καλλιέργειας

Τα εξεταζόμενα στελέχη μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να αποχρωματίσουν το απόβλητο, να μειώσουν το φαινολικό του φορτίο και να παράγουν λιγνινολυτικά ένζυμα.

Στο στέλεχος *P. citrinopileatus* παρατηρήθηκε ενζυμική ενεργότητα λακκάσης $0,205 \text{ U ml}^{-1}$ όταν αυτό καλλιεργήθηκε σε pH 5 και 6. Αντίθετα, τα στελέχη *I. lacteus* και *G. lucidum* παρήγαγαν λακκάση με μέγιστη ενεργότητα $0,009 \text{ U ml}^{-1}$ και $0,006 \text{ U ml}^{-1}$ όταν καλλιεργήθηκαν σε pH 7 και 9 αντίστοιχα, δηλαδή μία τάξη μεγέθους μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη στο στέλεχος *P. citrinopileatus*. Σε αντίστοιχη μελέτη (Ntougias et al., 2012) επιτεύχθηκε ενζυμική ενεργότητα λακκάσης $0,107\text{-}0,118 \text{ U ml}^{-1}$ για στελέχη του γένους *Pleurotus* και $0,019\text{-}0,021 \text{ U ml}^{-1}$ για στελέχη του γένους *Ganoderma*., αποτελέσματα συγκρίσιμα με της παρούσας εργασίας.

Όσον αφορά στον αποχρωματισμό του αποβλήτου, στην καλλιέργεια του στελέχους *P. citrinopileatus* επιτεύχθηκε 80% αποχρωματισμός όταν καλλιεργήθηκε σε pH 4 και 40% αποχρωματισμός όταν καλλιεργήθηκε σε pH 5 και 6. Αντίστοιχα, το στέλεχος *I. lacteus* αποχρωμάτισε το απόβλητο κατά 30% σε καλλιέργεια με pH 5 και το στέλεχος *G. lucidum* κατά 40% σε καλλιέργεια με pH 4. Από το πείραμα προκύπτει ότι ο αποχρωματισμός του αποβλήτου από όλα τα στελέχη είναι πιο έντονος όταν το pH της καλλιέργειας είναι όξινο, δηλαδή κυμαίνεται από 4 έως 6. Ανάλογα αποτελέσματα παρουσιάζουν στην εργασία τους και ο Ντούγιας με τους συνεργάτες του (2012), όπου πέτυχαν αποχρωματισμό του αποβλήτου 31-40% για στελέχη του γένους *Ganoderma* και 41-44% για στελέχη του γένους *Pleurotus*.

Ο κύριος στόχος στην επεξεργασία του κατσίγαρου είναι η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων. Από το πείραμα προκύπτει ότι το φαινολικό φορτίο του αποβλήτου μειώθηκε κατά 84% και 68% για το στέλεχος *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* αντίστοιχα, όταν αυτά καλλιεργήθηκαν σε pH 5. Γενικά, παρατηρήθηκε ότι ο βασιδιομύκητας *P. citrinopileatus* επιτυγχάνει μείωση των φαινολικών ενώσεων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60% σε όλες σχεδόν τις συνθήκες καλλιέργειας, δηλαδή σε pH καλλιέργειας από 5 έως και 8. Στον αντίποδα, στο στέλεχος *G. lucidum* δεν παρατηρήθηκε μείωση του φαινολικού φορτίου. Από άλλους ερευνητές (Aggelis et al., 2003; Fountoulakis et al., 2002; Kissi et al., 2001) έχει επιτευχθεί μείωση φαινολικών ενώσεων στα υγρά απόβλητα ελαιουργείου έως και 80% για στελέχη του γένους *Pleurotus*.

Τέλος, η παραχθείσα βιομάζα από την καλλιέργεια των στελεχών *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* φτάνει τα $1,6 \text{ mg ml}^{-1}$ καλλιέργειας όταν αυτά καλλιεργούνται σε pH 5 και 6. Η ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αποικοδόμηση του αποβλήτου, καθώς στις συνθήκες καλλιέργειας που προέκυψε η μέγιστη βιομάζα, παρατηρήθηκε και η υψηλότερη αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου.

Το πείραμα αυτό επιβεβαιώνει την ικανότητα των στελεχών *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε υγρά απόβλητα ελαιουργείου, παρά την τοξικότητα αυτού του υποστρώματος. Οι περισσότεροι μύκητες λευκής σήψης αναπτύσσονται καλά σε υποστρώματα με ελαφρώς όξινα pH, μεταξύ 4 και 5 (Reid, 1989).

5.3. Πείραμα Β: Εύρεση βέλτιστου ρυθμού ανάδευσης

Από το πείραμα για την εύρεση του βέλτιστου ρυθμού ανάδευσης προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος *P. citrinopileatus* αναπτύσσεται καλύτερα υπό ανάδευση, και μάλιστα έντονη ανάδευση (150 rpm). Στη συνθήκη ανάδευσης των 150 rpm το στέλεχος *P. citrinopileatus* παρουσίασε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα σε ότι αφορά όλες τις εξεταζόμενες παραμέτρους, δηλαδή:

- Ενζυμική ενεργότητα λακκάσης: $0,32 \text{ U ml}^{-1}$
- Αποχρωματισμός αποβλήτου: 73,5%
- Μείωση φαινολικού φορτίου: 88,3%
- Βιομάζα: $8,567 \text{ mg ml}^{-1}$
- Μείωση αναγωγικών σακχάρων 30%

Τα αποτελέσματα δεν είναι εξίσου ενθαρρυντικά για τα στελέχη *I. lacteus* και *G. lucidum* καθώς αυτά επέφεραν μείωση του φαινολικού φορτίου μόνο κατά 10%, ενώ δεν παρατηρήθηκε αποχρωματισμός του αποβλήτου σε ικανοποιητικό βαθμό.

Σε αντίστοιχες μελέτες έχει επιτευχθεί αποχρωματισμός 70,3% και μείωση φαινολικών ενώσεων 51,7% όταν οι εξεταζόμενοι βασιδιομύκητες καλλιεργήθηκαν υπό ανάδευση 70 rpm (Blanquez et al., 2002), ενώ υπό ανάδευση 120 rpm η μείωση των φαινολικών ενώσεων έφτασε το 76% σε άλλη μελέτη (Justino et al., 2010). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν το συμπέρασμα ότι η έντονη ανάδευση συνεισφέρει θετικά στην αποικοδόμηση του κατσίγαρου.

Ο περιορισμός του οξυγόνου, λόγω απουσίας ανάδευσης στην στατική καλλιέργεια, είναι πιθανότατα και ο κύριος παράγοντας που επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη του στελέχους *P. citrinopileatus*. Αντίθετα, η έντονη ανάδευση προσφέρει καλύτερο αερισμό στην καλλιέργεια, με αποτέλεσμα την καλύτερη ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Flores et al., 2010). Οι μύκητες είναι εξάλλου αερόβιοι μικροοργανισμοί και ο καλός αερισμός είναι προϋπόθεση για την καλή ανάπτυξή τους. Ο βαθμός ανάπτυξης για τους αερόβιους μικροοργανισμούς εξαρτάται από το διαθέσιμο διαλυμένο οξυγόνο στην καλλιέργεια. Το οξυγόνο έχει περιορισμένη διαλυτότητα στα υγρά και γι' αυτό είναι απαραίτητος ο καλός αερισμός του υγρού μέσου, ώστε να παρέχεται διαλυμένο οξυγόνο (Brock & Madigan, 1988). Η ανάδευση προσφέρει μεγαλύτερη υγρή επιφάνεια, η οποία έρχεται σε επαφή με τον αέρα και από εκεί το οξυγόνο εισέρχεται στην υγρή καλλιέργεια. Επιπλέον, η ανάδευση προσφέρει καλύτερη ανάμιξη των θρεπτικών συστατικών και επομένως ομοιογένεια. Τέλος, η ισχυρή επίδραση του οξυγόνου βρίσκεται σε συμφωνία με την οξειδωτική φύση των λιγνινολυτικών ενζύμων.

5.4. Πείραμα Γ: Εύρεση βέλτιστης πηγής αζώτου

Στο τελευταίο πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης διάφορων πηγών αζώτου στη καλλιέργεια των μικροοργανισμών. Εν συντομία, προκύπτει ότι η βέλτιστη πηγή αζώτου για το βασιδιομύκητα *P. citrinopileatus* είναι το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού (corn steep liquor). Ομοίως, η λιγνινολυτική δραστηριότητα του βασιδιομύκητα *I. lacteus* ενισχύεται από την παρουσία τόσο των δύο προαναφερθέντων πηγών αζώτου όσο και του τρυγικού διαμμωνίου. Σύμφωνα με τον Kaal και τους συνεργάτες του (1995), η λιγνινολυτική δραστηριότητα των μυκήτων λευκής σήψης ενισχύεται με την προσθήκη διάφορων πηγών αζώτου, γεγονός το οποίο αποδείχτηκε και στην παρούσα εργασία. Ωστόσο, η επίδραση κάθε πηγής αζώτου διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα γένη αλλά και στα στελέχη των μυκήτων λευκής σήψης.

Πιο αναλυτικά, η ενζυμική ενεργότητα λακκάσης έφτασε τα 7,78 U ml⁻¹ με προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης και τα 1,43 U ml⁻¹ με προσθήκη εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού για το στέλεχος *P. citrinopileatus*. Η αντίστοιχη ενεργότητα στα στελέχη *I. lacteus* και *G. lucidum* ήταν πολύ μικρή και σε καμία περίπτωση συγκρίσιμη με του στελέχους *P. citrinopileatus*. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι ενώ οι οργανικές πηγές αζώτου ενίσχυσαν την παραγωγή λακκάσης

από το στέλεχος *P. citrinopileatus*, οι ανόργανες πηγές την κατέστειλαν. Αυτό πιθανώς οφείλεται στη σύνθεση των οργανικών πηγών αζώτου, οι οποίες είναι πλούσιες σε αμινοξέα και βιταμίνες που προάγουν την ανάπτυξη βιομάζας από τον οργανισμό. Οι βασιδιομύκητες καταναλώνουν τα έτοιμα αμινοξέα που τους παρέχονται και αναπτύσσονται περισσότερο. Αντίθετα, οι ανόργανες πηγές αζώτου προσφέρουν το άζωτο στους μικροοργανισμούς με τη μορφή νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων. Αυτό σημαίνει ότι οι μικροοργανισμοί πρέπει να καταναλώσουν ενέργεια για να συνθέσουν τα απαραίτητα αμινοξέα, μία διαδικασία ενεργειακά ασύμφορη για αυτούς (Gern et al., 2008).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ειδική ενζυμική ενεργότητα του στελέχους *P. citrinopileatus* με προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης ήταν $0,09 \text{ U mg}^{-1}$, ενώ η αντίστοιχη ειδική ενζυμική ενεργότητα στην καλλιέργεια με προσθήκη εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού ήταν μόλις $0,007 \text{ U mg}^{-1}$.

Όσον αφορά στον προσδιορισμό της ενεργότητας των υπεροξειδασών, το στέλεχος *P. citrinopileatus* παρουσίασε ενεργότητα LiP και MnP $0,32 \text{ U ml}^{-1}$ και $0,21 \text{ U ml}^{-1}$ αντίστοιχα, μόνο στην καλλιέργεια με προσθήκη εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού ως πηγή αζώτου. Το στέλεχος *I. lacteus* εμφάνισε μέγιστη ενεργότητα LiP 6 U ml^{-1} όταν καλλιεργήθηκε με προσθήκη νιτρικού αμμωνίου και μέγιστη ενεργότητα MnP $0,51 \text{ U ml}^{-1}$ όταν καλλιεργήθηκε με προσθήκη τρυγικού διαμμωνίου. Η ενζυμική ενεργότητα των υπεροξειδασών φαίνεται να ενισχύεται από τις αμμωνιακές πηγές αζώτου, στην περίπτωση του στελέχους *I. lacteus*.

Σύμφωνα με την Hattaka (1994), κάθε μύκητας λευκής σήψης εκφράζει διαφορετικό συνδυασμό λιγνινολυτικών ενζύμων. Το γεγονός αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, καθώς σε κανένα στέλεχος δεν προσδιορίστηκε αξιοσημείωτη ενεργότητα και των τριών ενζύμων. Συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα που παρατίθενται παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η λιγνινολυτική δραστηριότητα του στελέχους *P. citrinopileatus* οφείλεται σε λιγνινολυτικά ένζυμα με ενεργότητα λακκάσης. Εξάιρεση αποτελεί η εμπλουτισμένη με εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού καλλιέργεια του στην οποία προσδιορίστηκε και ενεργότητα υπεροξειδασών. Αντίθετα, στο στέλεχος *I. lacteus* εκφράζονται μόνο υπεροξειδάσες της λιγνίνης και υπεροξειδάσες του μαγγανίου.

Στις καλλιέργειες του στελέχους *P. citrinopileatus* επιτεύχθηκε μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων κατά 80% όταν καλλιεργήθηκε είτε χωρίς προσθήκη αζώτου είτε με προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης και εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού. Αντίστοιχο είναι το ποσοστό και για το στέλεχος *I. lacteus* (86%) όταν αυτό καλλιεργήθηκε με προσθήκη τρυγικού διαμμωνίου, εκχυλίσματος ζύμης και εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού.

Ο υψηλότερος αποχρωματισμός του αποβλήτου παρατηρήθηκε για το στέλεχος *P. citrinopileatus* στην εμπλουτισμένη με εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού καλλιέργεια (79%). Το στέλεχος *I. lacteus* αποχρωμάτισε το απόβλητο

σε ποσοστό που κυμάνθηκε μεταξύ 49-80%, όταν καλλιεργήθηκε με προσθήκη νιτρικού αμμωνίου (49%), εκχυλίσματος ζύμης (50%), τρυγικού διαμμωνίου (75%) και εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού (80%).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα στελέχη *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* εκφράζουν διαφορετικά λιγνινολυτικά ένζυμα, δηλαδή έχουν υιοθετήσει διαφορετική ενζυμική στρατηγική αποικοδόμησης της λιγνίνης. Ωστόσο, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του αποχρωματισμού του αποβλήτου και της μείωσης του φαινολικού του φορτίου, προκύπτει το συμπέρασμα ότι και οι δύο βασιδιομύκητες αποικοδομούν αποτελεσματικά τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου ανεξαρτήτως του είδους των λιγνινολυτικών ενζύμων που εκφράζουν.

Μετά από δοκιμή διαφορετικών πηγών αζώτου σε υγρές καλλιέργειες διαπιστώθηκε ότι οι σύνθετες πηγές, όπως το εκχύλισμα ζύμης και το εκχύλισμα επεξεργασίας σπορών καλαμποκιού οδήγησαν σε καλύτερη μυκηλιακή ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, η προσθήκη εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού είχε σαν αποτέλεσμα η παραγόμενη βιομάζα να φτάσει τα 127,2 mg ml⁻¹ και 77,3 mg ml⁻¹ στα στελέχη *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* αντίστοιχα, όταν η βιομάζα που προέκυψε χωρίς την προσθήκη αζώτου ήταν μόλις 4,1 mg ml⁻¹ και 0,3 mg ml⁻¹. Οι Leatham και Kirk απέδειξαν σε μελέτη τους (1983) ότι η συγκέντρωση της παραγόμενης βιομάζας αυξάνεται με την προθήκη αζώτου. Μάλιστα, οι οργανικές πηγές αζώτου οδηγούν σε μεγαλύτερη ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων, σύμφωνα με τον Kaal και τους συνεργάτες του (1995). Οι περισσότεροι βασιδιομύκητες προτιμούν τις σύνθετες πηγές αζώτου μιας και αυτές περιέχουν αμινοξέα που δεν μπορούν οι ίδιοι οι μικροοργανισμοί να συνθέσουν. Από αυτές που δοκιμάστηκαν, το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού είναι μία οικονομικά συμφέρουσα πηγή αζώτου, πλούσια σε άζωτο, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και ελεύθερα αμινοξέα. Η ανάδειξη του εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού ως τη βέλτιστη πηγή αζώτου για την καλλιέργεια των στελεχών στην παρούσα εργασία ταυτίζεται με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από ανάλογες εργασίες (Gern et al., 2008; Papaspyridi et al., 2010).

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου περιέχουν σε μεγάλο ποσοστό σάκχαρα, τα οποία χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς ως πηγή ενέργειας. Μάλιστα θεωρείται ότι η αύξηση της βιομάζας των μικροοργανισμών οφείλεται σε πρώτο στάδιο στην κατανάλωση των σακχάρων και σε δεύτερο στάδιο στη διάσπαση των φαινολών, καθώς τα σάκχαρα προτιμώνται από τους μικροοργανισμούς ως πηγή άνθρακα σε σχέση με τις φαινολικές ενώσεις. Η μείωση των αναγωγικών σακχάρων φτάνει το 80% για το στέλεχος *P. citrinopileatus* με προσθήκη εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού και το 70% για το στέλεχος *I. lacteus* με προσθήκη τρυγικού διαμμωνίου.

Τέλος, προσδιορίστηκε η ικανότητα των μικροοργανισμών να εκφράσουν το ένζυμο λιπάση. Μόνο το στέλεχος *P. citrinopileatus* παρήγαγε το ένζυμο αυτό όταν καλλιεργήθηκε με προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης και η ενεργότητα που μετρήθηκε ήταν 0,058 U ml⁻¹. Ιδιαίτερα καλή αποδοτικότητα στην παραγωγή λιπάσης έχουν

παρουσιάζει διάφοροι μικροοργανισμοί, μεταξύ των οποίων οι *Candida cylindracea*, *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium citrinum* και άλλοι μύκητες (Abrunhosa et al., 2013). Το μεγάλο εύρος εφαρμογών των λιπασών καθιστούν τη δυνατότητα παραγωγής του συγκεκριμένου ενζύμου από υγρά απόβλητα ελαιουργείου ιδιαίτερα σημαντική. Τα ΥΑΕ περιέχουν υπολείμματα λαδιού, τα οποία καθιστούν το απόβλητο ένα δυνητικά κατάλληλο υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για λιπολυτικούς μικροοργανισμούς, καθώς προάγουν την παραγωγή του ενζύμου λιπάση (Brozzoli et al., 2009).

5.5. Γενικά συμπεράσματα

- Οι βασιδιομύκητες *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε υγρή καλλιέργεια με υπόστρωμα υγρά απόβλητα ελαιουργείου σε συγκέντρωση 25% v/v. Αντίθετα, το στέλεχος *G. lucidum* δεν εμφανίζει ικανοποιητική ανάπτυξη σε ΥΑΕ. Ενδιαφέρον θα είχε η περαιτέρω μελέτη της συγκέντρωσης του υποστρώματος, ώστε να διευκρινιστεί η ικανότητα των συγκεκριμένων βασιδιομυκήτων να αναπτυχθούν και σε πιο πυκνό υπόστρωμα από ΥΑΕ, καθώς και σε μη αποστειρωμένο υπόστρωμα.
- Η έντονη ανάδευση προσφέρει καλύτερο αερισμό της καλλιέργειας και επομένως, προάγει την ανάπτυξη βιομάζας και άρα τη λιγνιολυτική δραστηριότητα των βασιδιομυκήτων. Μάλιστα, στην περίπτωση προσθήκης άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως γίνεται και στο πείραμα για την εύρεση της βέλτιστης πηγής αζώτου, η έντονη ανάδευση προσφέρει καλύτερη ομοιογένεια στην καλλιέργεια.
- Το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού (Corn Steep Liquor) είναι μία οικονομικά συμφέρουσα πηγή αζώτου, η οποία είναι πλούσια σε άζωτο, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και ελεύθερα αμινοξέα. Τα συστατικά αυτά, όπως προκύπτει από το πείραμα Γ, επιδρούν θετικά στο μεταβολισμό των βασιδιομυκήτων και ενισχύουν τη μυκηλιακή ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, η βιομάζα που προκύπτει με την προσθήκη corn steep liquor είναι έως και 30 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου.
- Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αποικοδόμηση των ΥΑΕ. Στις συνθήκες καλλιέργειας που επιτεύχθηκε η μέγιστη βιομάζα, παρατηρήθηκε αντίστοιχα ο υψηλότερος αποχρωματισμός του αποβλήτου καθώς και η υψηλότερη μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου. Η μείωση του φαινολικού φορτίου φτάνει το 90%, ενώ ο αποχρωματισμός του αποβλήτου το 80%, γεγονός που αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα των εξεταζόμενων στελεχών στην αποτοξικοποίηση ΥΑΕ.
- Η αποτελεσματικότητα των μυκήτων λευκής σήψης στην αποδόμηση των ΥΑΕ οφείλεται στην ικανότητά τους να παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα ικανά να μεταβολίσουν φαινολικές ενώσεις, ταννίνες καθώς και άλλες

ενώσεις παρεμφερών δομών. Φάνηκε ότι οι βασιδιομύκητες *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* ακολούθησαν διαφορετικές ενζυμικές οδούς για την αποτοξικοποίηση των ΥΑΕ. Συγκεκριμένα, η λιγνινολυτική δραστηριότητα του στελέχους *P. citrinopileatus* οφείλεται κατά κύριο λόγο σε ενζυμική ενεργότητα λακκάσης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος είτε δεν εκφράζει σε μεγάλο βαθμό υπεροξειδάσες είτε ότι η παραγωγή των υπεροξειδασών απαιτεί διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Ανάλογο συμπέρασμα προκύπτει για το στέλεχος *I. lacteus* και το ένζυμο λακκάση, καθώς στην παρούσα εργασία το στέλεχος *I. lacteus* παρουσίασε κατά κύριο λόγο ενζυμική ενεργότητα υπεροξειδασών.

- Τέλος, μελετήθηκαν οι φαινολικές ενώσεις που προσροφώνται στη βιομάζα, για να αποκλειστεί η περίπτωση η μείωση των φαινολών που παρατηρείται να οφείλεται σε αυτό το φαινόμενο. Προέκυψε ότι η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων ενδοκυτταρικά είναι τουλάχιστον 2 τάξεις μεγέθους μικρότερη από τη μείωση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου που παρατηρήθηκε. Επομένως, η αποικοδόμηση των ΥΑΕ είναι πραγματικά αποτέλεσμα της δράσης των λιγνινολυτικών ενζύμων.

5.6. Μελλοντικοί στόχοι

Η ρύπανση από τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου αποτελεί περιβαλλοντικό πρόβλημα με ιδιαίτερη σημασία όχι μόνο για την Ελλάδα, αλλά και για όλες τις ελαιοπαραγωγικές χώρες. Η διατάραξη που προκαλούν τα ΥΑΕ στα φυσικά οικοσυστήματα οφείλεται κυρίως στο πολύ υψηλό οργανικό φορτίο που φέρουν. Η αποικοδόμηση των ΥΑΕ με χρήση λιγνινολυτικών μυκήτων είναι μία αποτελεσματική μέθοδος αποτοξικοποίησης, κατά την οποία μπορούν να παραχθούν και παραπροϊόντα με εμπορική αξία. Από τα αποτελέσματα της διπλωματικής εργασίας προκύπτουν οι ακόλουθες προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.

- Πολύ σημαντική είναι η εξέταση επιπλέον παραμέτρων που επιδρούν στην ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων και στη λιγνινολυτική τους δραστηριότητα. Τέτοιοι παράμετροι θα μπορούσαν να είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του αποβλήτου και η συγκέντρωση του αζώτου.
- Δεδομένου ότι η αποικοδόμηση των ΥΑΕ που επιτεύχθηκε στη συγκεκριμένη εργασία ήταν πολύ υψηλή, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η μεταφορά και προσαρμογή της μελέτης αυτής σε μεγάλη κλίμακα.
- Κατά την επεξεργασία των ΥΑΕ με λιγνινολυτικούς μύκητες παράγονται παραπροϊόντα, όπως το εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας, που διατίθεται περαιτέρω ως ζωοτροφή, βιολίπασμα ή βελτιωτικό εδάφους, ενώ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ακόμα και στην εμπορική καλλιέργεια των μανιταριών.
- Θα μπορούσε να μελετηθεί ακόμα η δυνατότητα παραγωγής πολυσακχαριτών καθώς και δευτερογενών μεταβολιτών από τη δράση των λιγνινολυτικών

μυκήτων. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να έχουν ποικίλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές ως φυσικά φάρμακα και πολύτιμα διατροφικά συστατικά.

- Τέλος, η δυνατότητα έκφρασης των λιγνινολυτικών ενζύμων από τους μύκητες λευκής σήψης είναι πολύ σημαντική, καθώς τα ένζυμα αυτά (λακκάσες, υπεροξειδάσες, αλλά και λιπάσες) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοκαταλύτες σε ένα πολύ μεγάλο εύρος βιομηχανικών εφαρμογών.

Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Abrunhosa L., Oliveira F., Dantas D., Gonçalves C., Belo I. (2013). Lipase production by *Aspergillus ibericus* using olive mill wastewater., *Bioprocess and Biosystems Engineering*
- Aggelis G.G., Gavala H.N., Lyberatos G. (2001). Combined and separate aerobic biotreatment of green olive debittering wastewater. *Journal of Agricultural Engineering Research* 80, 283-292.
- Andrich G., Balsini S., Zinnai A., Silvestri S. and Fiorentini R. (1992). Effect of olive oil waste water irrigation on olive plant products. *Agricoltura Mediterranea* 122, 97-100.
- Arora DS and Sharma RK. (2010). Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications
- Azbar N., Bayram A., Filibeli A., Muezzinoglu A., Sengul F. and Ozer A., (2004), A review of waste management options in olive oil production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, pp. 209-247
- Baldrian P., Zervakis GI., Merhautova V., Ntougias S., Ehaliotis C. and Nerud F.(2006). The use of hydroxyl-radical-generating systems for the treatment of olive mill wastewaters. *Folia Microbiologica* 51, 337-341
- Balis C., Chjatjipavlidis J. and Flouri F. (1991). Integrated management of olive oil mills wastewaters. In *Proceedings of the International Seminar 'Management of olive mills wastes'*, pp. 66-74. Geotechnical Chamber of Greece, Chania, Crete
- Barclay CD, Moore DM, Lander SR, and Legge RL. (1990). Heat-denaturation kinetics of lignin peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 778-782
- Blanchette RA. (1995). Degradation of lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.*, 73, 999-1010
- Blanchette RA., Cease KR., and Abad AR. (1991). An evaluation of different forms of deterioration found in archaeological wood. *Int. Biodeter.*
- Blánquez P., Caminal G., Sarrà M., Vicent M. T., Gabarrell X. (2002). Olive Oil Mill Waste Waters Decoloration and Detoxification in a Bioreactor by the White Rot Fungus *Phanerochaete flavidio-alba*, *Biotechnology Progress*, Volume 18, Issue 3, Pages 660-662
- Borja R., Garrido S. E., Martinez L., Ramos-Cormenzana A. and Martin A. (1993). Kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater previously fermented with *Aspergillus terreus*. *Process Biochemistry* 28
- Bourbonnais R, and Paice MG. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin degradation. *FEBS Lett.*, 267, 99-102
- Briving C, Gandvik EK, and Nyman PO. (1980). Structural studies around cysteine and cysteine residues in the "blue" oxidase fungal laccase B. Similarity in amino acid sequence with ceruloplasmin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93, 454-461

- Brock, T D and Madigan, M T. (1988). *Biology of Microorganisms*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall
- Brozzoli V., Crognale S., Sampedro I., Federici F., D'Annibale A., Petruccioli M. (2009), Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor, *Bioresource Technology*, Volume 100, Issue 13, pp 3395-3402
- Buswell JA. Fungal degradation of lignin. In D. K. Arora, B. Rai, K.G. Mukerji, and G.R. Knudson (eds). (1991). *Handbook of applied Mycology*, Vol 1, Marcel Dekker, New York, 425-479
- Cabrera F., Lopez R., Martinez-Bordiú A., Dupuy de Lome E. and Murillo J.M. (1996). Land treatment of olive oil mill waste water. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38, 215-225.
- Casa R., D'Annibale A., Rieruccetti F., Stazi, S. R., Sermani G. G. and Lo Cascio B. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 50, 959-966.
- Chang ST. (1999). World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. *Int. J. Med. Mushrooms*, 1, 291-300
- Chen Y., Sarkanen S. and Wang Y.Y. (2012). Lignin-Degrading Enzyme Activities
- Cohen R, Persky L, and Hadar Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wooddegrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 582-594
- Cui F. and Dolphin D. (1990). The role of manganese in model systems related to a nylon-degrading enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1366-1371
- Daniel G. and Nilsson T. (1998). Developments in the study of soft rot and bacterial decay. In Bruce A., Palfreyman J.W. (eds). *Forest Products Biotechnology*. Taylor & Francis, Great Britain, 37-62
- Denchev C. M., Venturella G. and Zervakis G. (2013). Identification and sustainable exploitation of wild edible mushrooms in rural areas. *Mycoticon* textbook
- Dey S, Maiti TK, and Bhattacharyya BC. (1994). Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Polyporus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4216-4218
- Dey S, Maiti TK, and Bhattacharyya BC. (1991). Lignin peroxidase production by a brown rot fungus *Polyporus ostreiformis*. *J. Ferm. Bioeng.*, 72, 402-404
- Di Giovacchino L., Mascolo A. (1988). Incidenza delle tecniche operative nell'estrazione dell'olio dalle olive con il sistema continuo. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 65, 283-289.
- Dias A. A., Bezerra R. M. and Pereira A. N. (2004). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology* 92, 7-13.
- Dix NJ. and Webster J. (1995). *Fungal Ecology*. Chapman and Hall, Cambridge, Great Britain

- Eaton RA, and Hale MDC. (1993). Wood. Decay, pests and protection. Chapman & Hall, Cambridge, Great Britain
- Ehaliotis C., Zervakis G., Anoliefo O., Papadopoulou K. and Kardimaki A. (2003). The capacity of agricultural soils to auto-regulate bioremediation of olive-mill waste water. In *The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions*, pp. 353-358 (Eds. V. Sasek, J.A. Glaser and P. Baveye). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Eriksson KEL, Blanchette RA, and Ander P. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Germany
- Escolano Bueno A. (1975). Tests on removal of waste liquid from olive oil extraction (alpechin), by disposal in ponds or lagoons for percolation and evaporation. *Grasas y Aceites* 26, 387-396.
- Fiestas Ros de Ursinos, J. A., and Borja-Padilla, R., (1992). "Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain", *Grasas y Aceites*, 43(2), p.101-106
- Flores C., Casasanero R., Trejo-Hernández M.R., Galindo E., Serrano-Carreón L. (2010). Production of laccases by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation in co-culture with *Trichoderma viride*, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 108, Issue 3, Pages 810-817
- Gadd G.M. (2001). Fungi in bioremediation
- Georgacakis D. and Dalis D. (1993). Controlled anaerobic digestion of settled olive oil wastewater. *Bioresource Technology* 46, 221-226.
- Gern R.M.M., Wisbeck E., Rampinelli J.R., Ninow J.L, Furlan S.A. (2008). Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides, *Bioresource Technology*, Volume 99, Issue 1, Pages 76-82
- Gernjak W., Krutzler T., Glaser A., Malato S., Caceres J., Bauer R. and Fernandez-Alba A. R. (2003). Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants. *Chemosphere* 50, 71-78.
- Glen JK. and Gold MH. (1985). Purification and characterisation of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 329-341
- Gold MH, Wariishi H, and Valli K. (1989). Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In J.R. Whitaker and P.E. Sonnet (eds) *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, Vol. ACS Symp. Ser. No 389, The American Chemical Society, Washington, 128-140
- Gold MH, Kuwahara A, Chiu A, and Glen JK. (1984). Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring diarylpropane oxygenase from the white rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1984, 234, 353-362
- González M. D., Moreno E., Quevedo-Sarmiento J. and Ramos-Cormenzana A. (1990). Studies on antibacterial activity of waste waters from olive oil mills (alpechin): Inhibitory activity of phenols and fatty acids. *Chemosphere* 20
- Greco G., Toscano G., Cioffi M., Gianfreda L. and Sannino F. (1999). Dephenolisation of olive mill waste-waters by olive husk, *Water Research*, Volume 33, Issue 13, pp.3046-3050

- Hatakka A. (2001). Biodegradation of lignin. In, Steinbüchel A. (ed). Biopolymers. Vol 1, Hofrichter M., Steinbüchel A. (eds). Lignin, Humic Substances and Coal. Wiley-VCH, Germany, 129-180
- Hatakka A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white rot fungi, production and role in lignin degradation. FEMS Microbiol. Rev. 13, 125-135
- Harris D.C. (2007). Quantitative Chemical Analysis, 7th edition, W. H. Freeman and Company
- Hestbjerg H, Willumsen PA, Christensen M, Andersen O, and Jacobsen CS. (2003). Bioaugmentation of tar-contaminated soils under field conditions using *Pleurotus ostreatus* refuse from commercial mushroom production. Environ. Toxicol. Chem., 22, 692-698
- Hofrichter M. (2002). Review, lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme Microb. Technol. 30, 454-466.
- Hofrichter M, Vares T, Kalsi M, Galkin S, Scheibner K, Fritsche W, and Hatakka A. (1999) Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1864-1870
- Jurasek I. (1995). Toward a three-dimensional model of lignin structure. J. Pulp and Paper Sci., 21, 274-279
- Justino B., Marques A.G., Duarte K.R., Duarte A.C., Pereira R., Rocha-Santos T., Freitas A.C. (2010). Degradation of phenols in olive oil mill wastewater by biological, enzymatic and photo-Fenton oxidation, Environmental Science and Pollution Research, Volume 17, Issue 3, Pages 650-656
- Kaal E., Field J., Joyce T. (1995). Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot Basidiomycetes by nitrogen-sufficient media, Bioresource Technology, Volume 53, Issue 2, Pages 133-139
- Kaim W. and Rall J. (1996). Copper-a modern bioelement. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35, 43-60
- Kappelakis E.I., Tsagarakis P.K., Crowther C.J. (2008). Olive oil history, production and by-product management, Review Environmental Science Biotechnology, 7, 1-26
- Kavroulakis N., Ehaliotis C., Ntougias S., Zervakis G.I. and Papadopoulou K.K. (2005). Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by compost derived from agricultural residues. Physiological and Molecular Plant Pathology 66, 163-174.
- Kirk TK, and Farrell RL. (1987). Enzymatic "combustion". The microbial degradation of lignin. Annu. Rev. Microbiol. 41, 465-505
- Kirk TK, Croan S, and Tien M. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*, Effect of selected growth conditions and use of a mutant. Enzyme Microbiol. Technol, 8, 27-32
- Kuhad R C, Singh A, and Eriksson KE. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In K.E. Eriksson (ed) Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, Springer- Verlag, Germany, 46-125
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, and Gold MH. (1984). Separation and characterisation of 2 extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic

cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 178, 1092-1098

- Lau KL, Tsang YY, and Chiu SW. (2003). Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. *Chemosphere*, 52, 1539-1546
- Leatham G.F. and Kirk T.K. (1983). Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 16, Issue 1, pages 65–67
- Lopez-Lopez MJ. (1993). Producción de polisacáridos (xantano) por *Xanthomonas campestris* utilizando como sustrato alpechín. Tesina. Fac. Farmacia. Univ. de Granada.
- Maciel MJM., Silva AC., Ribeiro HCT. (2010). Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review, Brazil
- Madigan MT, Martinko JM, and Parker J. (2000). *Brock. 1974 Biology of microorganisms*. 9th edition, Pentice Hall, UK
- Makela M, Galkin S, Hatakka A, and Lundell T. (2002). Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.*, 30, 542-549
- Mansur M, Suarez T, and Gonzalez A E. (1998). Differential Gene Expression in the Laccase Gene Family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 771 –774
- Martínez-Toledo M., González-López J., Rodelas B., Pozo C. and Salmerón V. (1995). Production of poly-β-hydroxybutyrate of *Azotobacter chroococcum* H23 in chemically defined medium and alpechín medium. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 413-418
- Messerschmidt A. and Huber R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase, and ceruloplasmin, Modeling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.* 187, 341-352
- Mester T. and Tien M. (2000). Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 46, 51 – 59
- Miller G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*
- Morillo J.A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N.J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes
- Niaounakis M. and Halvadakis C.P. (2006). *Olive Processing Waste Management -Literature Review and Patent Survey*, Second Edition, Elsevier,
- Niaounakis M. and Halvadakis C.P. (2004). *Olive-mill waste management. Literature Review and Patent Survey*. Typothito-George Dardanos.
- Ntougias S., Baldrian P., Ehaliotis C., Nerud F., Antoniou T., Merhautová V., Zervakis G. (2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*, *Chemosphere*, Volume 88, Issue 5, Pages 620-626
- Ntougias S., Ehaliotis C., Papadopoulou K.K. and Zervakis G. (2006a). Application of respiration and FDA hydrolysis measurements for estimating microbial activity during composting processes. *Biology and Fertility of Soils* 42, 330-337.

- Ntougias S., Ehaliotis C., Zervakis G.I., Katsaris P. and Papadopoulou K. (2003). Monitoring the composting process of different agricultural wastes and evaluation of the effects of the final products on plants. In: Proceedings of the 8th International Conference on Environmental Science and Technology, pp. 666-673 (Ed. T.D. Lekkas), University of the Aegean and Global NEST, Lemnos, Greece.
- Odier E. and Delattre M. (1990). Multiple lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 447-452
- Orth AB, Royse DJ, and Tien M. (1993). Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 4017-4023
- Ouzounidou G., Zervakis G.I. and Gaitis F. (2010). Raw and microbiologically detoxified olive mill waste and their impact on plant growth. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology* 4, 21-38.
- Papaspyridi L.M., Katapodis P., Gonou-Zagou Z., Kapsanaki-Gotsi E., Christakopoulos P. (2010). Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 50, Issue 3, Pages 131-138
- Paredes M.J., Ramos-Cormenzana A. and Martinez J. (1987). Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. *Chemosphere* 16, 1557-1564.
- Piotrowska A., Iamarino G., Antonietta R. M. and Gianfreda L. (2006). Short-term effects of olive mill waste water (OMW), on chemical and biochemical properties of semiarid Mediterranean soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 600-610.
- Popp JL, Kalyanaraman B, and Kirk TK. (1990). Lignin peroxidase oxidation of Mn²⁺ in the presence of veratryl alcohol, malonic or oxalic acid, and oxygen. *Biochemistry*, 29, 10475-10480
- Rajakumar S, Gaskell J, Gullen D, Lobos S, Karahanian E, and Vicuna R. (1996). LiP-like genes in *Phanerochaete sorbida*, and *Ceriporiopsis subvermispora*, white rot fungi with no detectable lignin peroxidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2660-2663
- Rayner ADM. and Boddy L. (1988). *Fungal decomposition of wood*. John Wiley & Sons, Great Britain
- Reid I. (1989). Solid-state fermentations for biological delignification, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 11, Issue 12, Pages 786-803
- Roig A., Cayuela M.L. and Sanchez-Monedero M.A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, Vol. 26, pp. 960-969
- Sánchez C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi, *Biotechnology Advances*, Volume 27, Issue 2, pp. 185-194
- Shamma N. Kh. (1984). Olive oil extraction waste treatment in Lebanon. *Effluent and Water Treatment Journal* 24, 388-392.
- Sharma R., Chisti Y., Banerjee U. (2001), Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, vol. 19, pp 627-662

- Sierra J., Marti E., Montserrat G., Cruanas R., Garau, M.A. (2001). Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal, *The Science of the Total Environment*, 279, 207-214
- Spinelli R. and Picchi G. (2010). Industrial harvesting of olive tree pruning residue for energy biomass. *Biosource Technology*, Vol.101, pp.730-735
- Svendsen A. (2000). Lipase protein engineering, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, Volume 1543, Issue 2, pp. 223-238
- Thurston CF. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19-26
- Tien M. and Kirk TK. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Burds. Science*, 221, 661-663
- Tsagaraki E., Lazarides H. N. and Petrotos K. B. (2006). Olive Mill Wastewater Treatment. In: *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, Springer US edition, p.133-157.
- Vermerris W., Nickolson R. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*
- Vlyssides A.G., Bouranis D.L., Loizidou M., and Karvouni G. (1996). Study of a demonstration plant for the co-composting of olive oil processing wastewater and solid residue. *Bioresource Technology*, 56, 187-193.
- Wariishi H, Valli K, and Gold MH. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, 267, 23688–23695
- Wariishi H, and Gold M H. (1990). Lignin peroxidase compound III. *J. Biol. Chem.* 65, 2070-2077
- Wariishi H, Valli K, Renganathan V, and Gold MH. (1989). Thiol-mediated oxidation of nonphenolic lignin model compounds by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 264, 14185–14191
- Waterhouse AL. (2001). Determination of Total Phenolics, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wiley
- Zervakis G. and Balis C. (1996b). Bioremediation of olive oil mill wastes through the production of fungal biomass. In: *Proceedings of the Second International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, pp. 311-323 (ed. D. Royse). Pennsylvania, USA.
- Zervakis G., Yiatras P. and Balis C. (1996). Edible mushrooms from olive mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38, 237-243.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Βλυσσίδης, Α. (1997). Μέθοδος διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων με το σύστημα της ηλεκτρόλυσης. *Επιστήμη και Τεχνολογία* 2,
- Δήμου Δ. (2005). Μύκητες-Μανιτάρια, Εισαγωγή στη βιολογία των μακρομυκήτων
- Ζερβάκης, Γ. (1999). Διαχείριση και αξιοποίηση των αποβλήτων και παραπροϊόντων των ελαιολιτριβείων. *Ελαιοπαραγωγή*, σελ. 98-103. Εύριπος Εκδοτική, Αθήνα.

- Ισραηλίδης, Ι.Κ. και Κωδούνη, Μ. Ι. (1982). Αξιοποίηση γεωργικών υπολειμμάτων και παραπροϊόντων για κτηνοτροφές και ενέργεια.. Γεωργική Έρευνα, 6, 243-253.
- Κάλφας Χ. (2007). Παραγωγή βιοαερίου από αναερόβια χώνευση προεπεξεργασμένου και μη ελαιοπολτού, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών
- Κυριτσάκης Α.(2007). *Το ελαιόλαδο*. Θεσσαλονίκη
- Μαρίνος, Ε. (1991). Συμπύκνωση δια λιμνάσεως. Πρακτικά Διεθνούς Σεμιναρίου για τη Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων, σελ. 130-152. ΓΕΩΤΕΕ-Παράρτημα Κρήτης και ΔΣΕ, Χανιά.
- Μιχελάκης, Ν. και Κουτσαυτάκης, Α. (1989). Το πρόβλημα των αποβλήτων των ελαιουργείων. Δυσκολίες και προοπτικές για την αντιμετώπισή του. Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων. Πρακτικά Ημερίδας,, σελ. 9-25. Ηράκλειο.
- Μιχελάκης, Ν. (2000). Απόβλητα ελαιοτριβείων: Οικονομικότητα εφικτότητα των μεθόδων διαχείρισης αποβλήτων. Εκδόσεις Γεωργική Τεχνολογία Ελαιοκομία, σελ. 150-157.
- Μπαλατσούρας Γ. (1997), Σύγχρονη ελαιοκομία - Το ελαιόλαδο. Ιδιωτική έκδοση, Αθήνα
- Μπαλής, Κ., Χατζηπαυλίδης, Ι. και Φλουρή, Φ. (1991). Ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων. Πρακτικά Διεθνούς Σεμιναρίου για τη Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων, σελ. 66-74. ΓΕΩΤΕΕ-Παράρτημα Κρήτης και ΔΣΕ, Χανιά.
- Μπλίκια Π. (2009). Βιοτεχνολογικές μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών
- Νταλής Δ. (1989). Αναερόβια βιολογική επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιουργείων προς παραγωγή βιοαερίου. Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων. Πρακτικά Ημερίδας 31 Μάρτη-Ηράκλειο σελ. 42-52.
- Οιχαλιώτης, Κ. Δ. και Ζερβάκης, Γ. (1999-2000). Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων δύο και τριών φάσεων. Μια αξιολόγηση της υφιστάμενης κατάστασης. Ελιά και Ελαιόλαδο 14, 52-61.
- Ποντίκης Κ. (2000). Ελαιοκομία. Εκδόσεις: Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα.
- Ταούκης Π., Τζιά Κ., Ωραιοπούλου Β.(2009). «Επιστήμη και μηχανική τροφίμων» Ε.Μ.Π, Αθήνα
- Φακλάρης Π.Α. και Σταματοπούλου Β.Γ,(1999), Η ελιά και το λάδι στην αρχαία Ελλάδα.
- Χατζηπαυλίδης Ι. (1999). Επιπτώσεις των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων στη δυναμική και τις δράσεις των μικροβιακών πληθυσμών εμπλουτισμού στο έδαφος, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Χρυσοβαλάντου Ν. (2010). Αξιολόγηση τριφασικής και διφασικής μεθόδου ελαιοποίησης του ελαιοκαρπού. Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Ηλεκτρονικές πηγές

- www.prosodol.gr : Τίτλος έργου “Στρατηγικές για τη βελτίωση και προστασία της ποιότητας των εδαφών από τη διάθεση αποβλήτων ελαιοτριβείων στην περιοχή της Μεσογείου” (LIFE07 ENV/GR/000280).
- www.faostat.fao.org : Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- www.mycobank.org
- www.theoliveoilsource.com