



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών
Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

Επίδραση συγκέντρωσης αζώτου στη μικροβιακή αξιοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείου

Μιοτέλη Δανάη

Επιβλέπων: Ευάγγελος Τόπακας (Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π)

Αθήνα 2015

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.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο της διπλωματικής εργασίας, Επίκουρο καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κ. Ευάγγελο Τόπακα, για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική υποστήριξη, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές στα στάδια εκπόνησης και συγγραφής της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Αναστασία Ζέρβα για την 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.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους υποψήφιους διδάκτορες και τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου για την πλήρη υποστήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου σπουδών μου.

Μιοτέλη Δανάη,

Αθήνα 2015

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Υγρό απόβλητο ελαιοτριβείων.....	7
1.2 Μέθοδοι επεξεργασίας υγρού αποβλήτου ελαιοτριβείων	14
1.2.1. ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	14
1.2.2.ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
1.2.3. ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
1.2.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
1.3 Ισχύουσα νομοθεσία για τη διάθεση των αποβλήτων των ελαιουργείων.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ	27
2.1 Εισαγωγή	27
2.1.1 Μύκητες λευκής σήψης	28
2.1.2 Μύκητες καστανόχρωμης σήψης	30
2.1.3 Μύκητες ελαφράς σήψης	31
2.2 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση των μυκήτων	32
2.3 Λιγνίνη	33
2.4 Λιγνινολυτικά ένζυμα.....	35
2.4.1. Υπεροξειδάση της λιγνίνης.....	37
2.4.2. Υπεροξειδάση του Μαγγανίου.....	40
2.4.3. Λακκάση	43
2.5 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές λιγνινολυτικών ενζύμων	46
2.6 Αξιολόγηση των μυκήτων λευκής σήψης στην βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα ελαιουργείων.....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	50
3.1 ΥΛΙΚΑ	50
3.1.1. Μικροοργανισμοί.....	50
3.1.2. Χημικά αντιδραστήρια – Αναλώσιμα υλικά.....	50
3.1.3. Συσκευές και Όργανα.....	51
3.1.4. Θρεπτικά υποστρώματα	51
3.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα.....	52
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	53
3.2.1. Μέτρηση ενεργότητας λακκάσης.....	53

3.2.1.2. Προσδιορισμός παραγόντων που επηρεάζουν την ενεργότητα της λακκάσης	54
3.2.2. Μέτρηση ενεργότητας υπεροξειδασών εξαρτημένων και ανεξάρτητων του μαγγανίου	55
3.2.3. Μέτρηση ενεργότητας υπεροξειδάσης της λιγνίνης	56
3.2.4. Μέτρηση ενεργότητας λιπάσης	57
3.2.5. Μέτρηση ολικών φαινολών	58
3.2.6. Μέτρηση ολικών φαινολών βιομάζας	59
3.2.7. Αποχρωματισμός αποβλήτου	59
3.2.8. Μέτρηση βιομάζας	60
3.2.9. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων	60
3.2.10. Μέτρηση γλυκόζης	60
3.2.11. Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών	61
3.2.13. Ζυμογράφημα	63
3.2.14. Χρώση πρωτεϊνών	64
3.3 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ	64
3.4 ΣΤΕΡΕΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	65
3.5 ΥΓΡΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	65
3.6 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
4.1 ΠΕΙΡΑΜΑ 1: ΣΥΣΤΑΣΗ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ	69
4.2 ΠΕΙΡΑΜΑ 2: ΕΥΡΕΣΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΛΑΚΚΑΣΗΣ	69
4.3 ΠΕΙΡΑΜΑ 3: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΗΓΗΣ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>P.citrinopileatus</i>	72
4.3.1. Ενεργότητα λακκάσης	72
4.3.2. Ενεργότητα υπεροξειδασών εξαρτημένων και ανεξάρτητων μαγγανίου	73
4.3.3. Ενεργότητα υπεροξειδάσης της λιγνίνης	75
4.3.4. Μέτρηση βιομάζας	75
4.3.5. Αποχρωματισμός αποβλήτου	76
4.3.6. Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων	77
4.3.7. Ικανότητα μείωσης ολικών φαινολικών	78
4.3.8. Μείωση φαινολών βιομάζας	78
4.3.9. Μέτρηση λιπασών	79
4.3.10. Ειδική ενεργότητα	79

4.4 ΠΕΙΡΑΜΑ 4: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΗΓΗΣ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>I.lacteus</i>	83
4.4.1. Ενεργότητα λακκάσης	83
4.4.2. Ενεργότητα υπεροξειδασών εξαρτημένων και ανεξάρτητων μαγγανίου	84
4.4.3. Ενεργότητα υπεροξειδάσης της λιγνίνης.....	86
4.4.4. Μέτρηση βιομάζας.....	86
4.4.5. Αποχρωματισμός αποβλήτου	87
4.4.6. Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων	88
4.4.7. Ικανότητα μείωσης ολικών φαινολικών	89
4.4.8. Μείωση φαινολών βιομάζας	89
4.4.9. Μέτρηση λιπασών.....	90
4.4.10. Ειδική ενεργότητα	90
4.5 ΠΕΙΡΑΜΑ 5: ΖΥΜΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ	94
4.5.1. Ζυμογράφημα λακκάσης του μύκητα <i>P.citrinopileatus</i>	94
4.5.2. Ζυμογράφημα υπεροξειδάσης που εξαρτάται από το μαγγάνιο του μύκητα <i>P.citrinopileatus</i>	95
4.5.3. Ζυμογράφημα υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του μαγγανίου του μύκητα <i>P.citrinopileatus</i>	96
4.6 ΠΕΙΡΑΜΑ 6: ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ ΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ	97
4.6.1. Ενεργότητα λακκάσης	97
4.6.2. Ενεργότητα υπεροξειδασών εξαρτημένων και ανεξάρτητων μαγγανίου	98
4.6.3. Μέτρηση βιομάζας.....	100
4.6.4. Αποχρωματισμός αποβλήτου	101
4.6.5. Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων	104
4.6.6. Ικανότητα μείωσης ολικών φαινολικών	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	106
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	106
5.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	106
5.3 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	109
5.4 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	111

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης αζώτου στην αποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείου με τη χρήση των μυκήτων λευκής σήψης *Pleurotus citrinopileatus* και *Irpex lacteus*.

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου χαρακτηρίζονται από σκούρο χρώμα, θολερότητα, χαρακτηριστική οσμή, οργανικά και ανόργανα συστατικά και υψηλό φαινολικό φορτίο. Έτσι, τα απόβλητα αυτά προκειμένου να αποδομηθούν σε υδάτινους και εδαφικούς αποδέκτες πρέπει να γίνει κατάλληλη επεξεργασία. Οι κύριες μέθοδοι επεξεργασίας είναι οι φυσικές, φυσικοχημικές, θερμικές και βιολογικές. 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 ένα από τα σπουδαιότερα και πιο άφθονα υλικά της φυτικής βιομάζας εκκρίνοντας παράλληλα λιγνινολυτικά ένζυμα. Τα ένζυμα αυτά, που είναι γνωστά και ως «λιγνινάσες», έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομούν και τις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα ΥΑΕ. Οι «λιγνινάσες» διακρίνονται σε φαινολικές οξειδάσες, στις οποίες ανήκουν οι λακκάσες (Lac) και σε υπεροξειδάσες, στις οποίες ανήκουν οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP), οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP) και οι ανεξάρτητες του μαγγανίου (MnIP).

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης αζώτου με στόχο της αποδόμηση του ΥΑΕ και την ανάπτυξη των μυκήτων. Χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού (Corn Steep Liquor) για την ανάπτυξη του *P.citrinopileatus* και τρυγικό διαμμόνιο για το *I.lacteus* σε συγκεντρώσεις 0, 5, 10, 20, 30 και 50 g/l. Ακολούθησε υπολογισμός της ενεργότητας των λιγνινολυτικών ενζύμων, της διάσπασης των φαινολικών ενώσεων, του αποχρωματισμού του αποβλήτου και της παραγόμενης βιομάζας. Για το στέλεχος *P.citrinopileatus* και για συγκέντρωση αζώτου 30 g/l έγινε προσαρμογή της διαδικασίας σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου.

Η αποικοδόμηση του αποβλήτου οφείλεται στη δράση των λιγνινολυτικών ενζύμων, τα οποία στην περίπτωση του *P. citrinopileatus* ήταν κυρίως οι λακκάσες με μέγιστη ενεργότητα 1342 U/l ενώ για το *I. lacteus* ήταν οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου με μέγιστη ενεργότητα 674 U/l. Οι μικροοργανισμοί *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* επέφεραν αποχρωματισμό του αποβλήτου 86% και 96% αντίστοιχα, και μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων μέχρι και 92%. Η παραχθείσα βιομάζα έφτασε τα 35 mg/ml καλλιέργειας στην περίπτωση του στελέχους *P. citrinopileatus* και τα 16 mg/ml καλλιέργειας για το στέλεχος *I. lacteus*. Η ανάπτυξη του *P. citrinopileatus* σε βιοαντιδραστήρα οδήγησε σε 84% ποσοστό αποχρωματισμού και 28% μείωση των φαινολικών.

ABSTRACT

The present diploma thesis studies the effect of nitrogen concentration on the degradation of olive mill wastes by the white rot fungi *Pleurotus citrinopileatus* and *Irpex lacteus*.

The liquid waste is characterized by their dark color, high turbidity, distinctive smell, organic and inorganic content and high phenolic load. Consequently, such waste has to be properly processed prior to disposal in aquatic and ground environments. The primary methods for processing such waste are physical, chemical, thermal and biological. The biological methods of degradation by microorganisms, such as fungi, are of great interest. White rot fungi have the ability to degrade lignin, one of the most abundant components of plant biomass by secreting ligninolytic enzymes. Those enzymes, known as «ligninases», also have the ability to degrade phenolic compounds of olive oil mill waste. Ligninases can be classified as either phenol oxidases [laccase (Lac)] or peroxidases [lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and manganese-independent peroxidase (MnIP)].

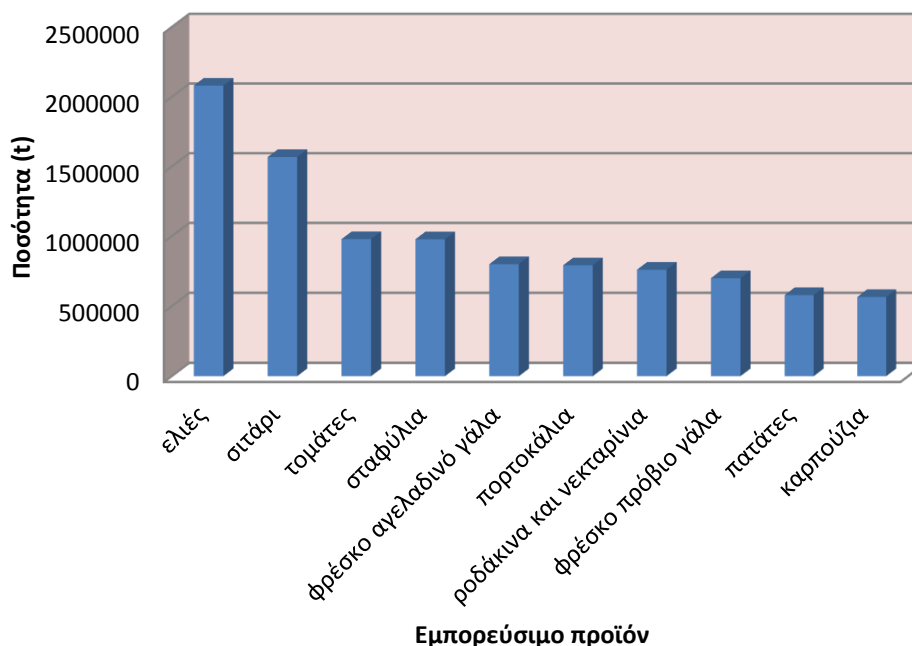
The aim of the present work is the discovery of the optimal nitrogen concentrations regarding the degradation of OOMW and fungal growth. Corn Steep Liquor was used as a nitrogen source for the growth of *P.citrinopileatus* and diammonium tartrate for *I.lacteus* with concentrations of 0, 5, 10, 20, 30 and 50 g/l. The parameters studied were the activity of ligninolytic enzymes, the degradation of phenolic compounds, the discoloration of the liquid waste and the biomass production. The process was also studied for a culture of *P.citrinopileatus* in a batch bioreactor with nitrogen concentration of 30g/l.

The degradation of the liquid waste is a result of the activity of ligninolytic enzymes, which, in the case of *P.citrinopileatus* were primarily laccases with a maximum activity of 1342 U/l and in the case of *I. lacteus*, were primarily manganese peroxidases with a maximum activity of 674 U/l. The growth of *P. citrinopileatus* and *I. lacteus* resulted in discoloration of the waste by 86% and 96% respectively and a reduction of phenolic compounds by up to 92%. The biomass concentration achieved for the *P. citrinopileatus* strain was 35 mg/ml and 156 mg/ml for the *I. lacteus* strain. The growth of *P. citrinopileatus* in the bioreactor resulted in 84% discoloration and 28% reduction of phenolics.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

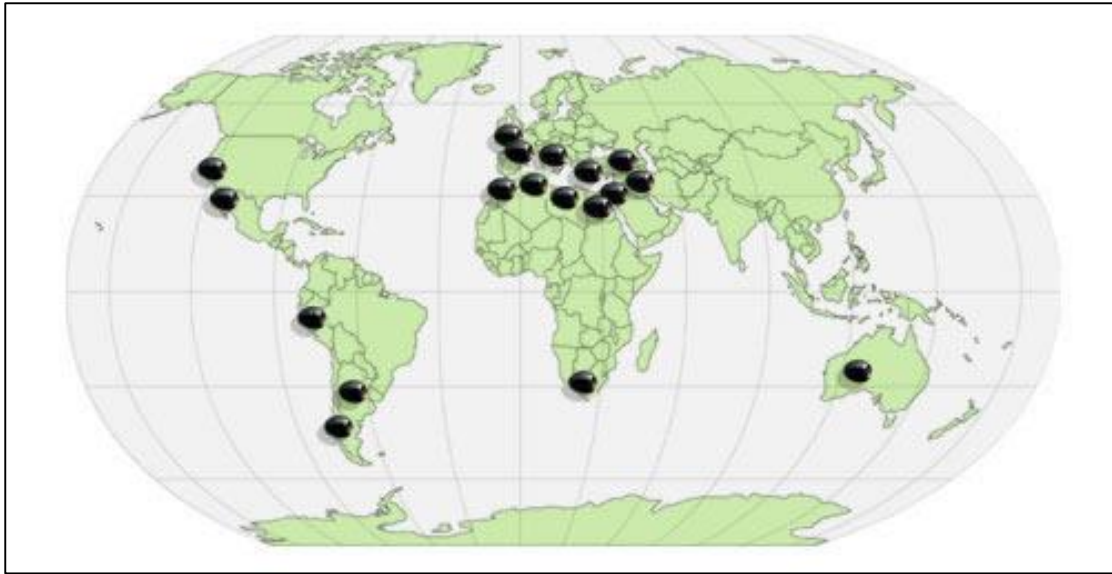
1.1 Υγρό απόβλητο ελαιοτριβείων

Στην Ελλάδα, ο ελαιόκαρπος αποτελεί ένα από τα βασικά αγροτικά προϊόντα. Η παραγωγή του εμφανίζει έντονη γεωργική δραστηριότητα όπως φαίνεται και παρακάτω (Εικόνα 1.1) [FAOSTAT,2012]. Συγκεκριμένα, η ετήσια παραγωγή ελαιοκάρπου για το 2012 ήταν 2.080.800 t.



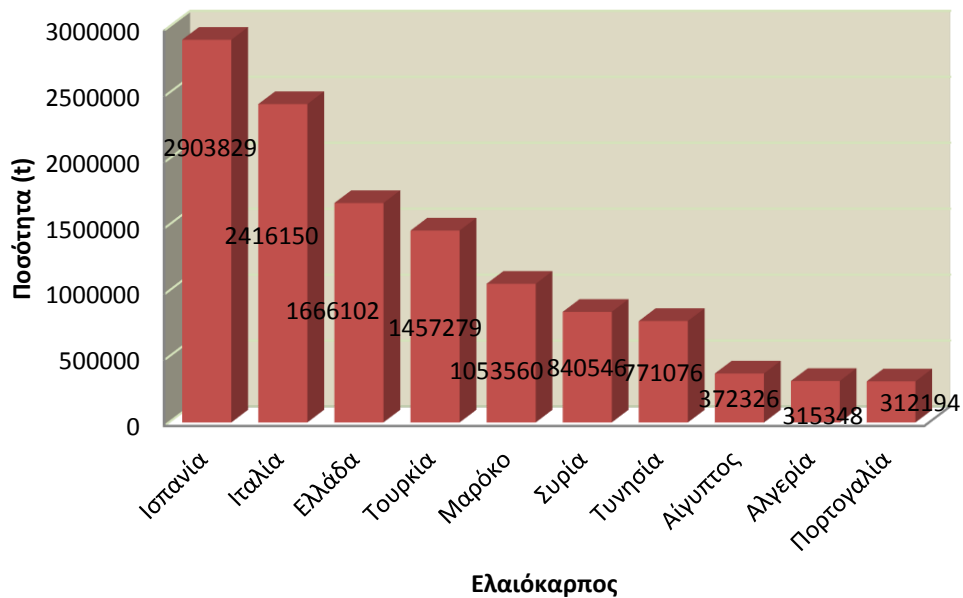
Εικόνα 1.1: Παραγωγή των 10 πιο σημαντικών εμπορεύσιμων προϊόντων σε τόνους για την Ελλάδα το 2012 (FAOSTAT, 2012)

Η καλλιέργεια ελαιόκαρπου έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, γεγονός που οφείλεται τόσο στην αύξηση του πληθυσμού όσο και στην εντατικοποίηση της καλλιέργειας με τη χρήση λιπασμάτων, φυτοφαρμάκων αλλά και νέων τεχνολογιών που βοηθούν στην επεξεργασία της ελιάς. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1.2) παρουσιάζεται ο παγκόσμιος χάρτης παραγωγής ελαιόκαρπου.



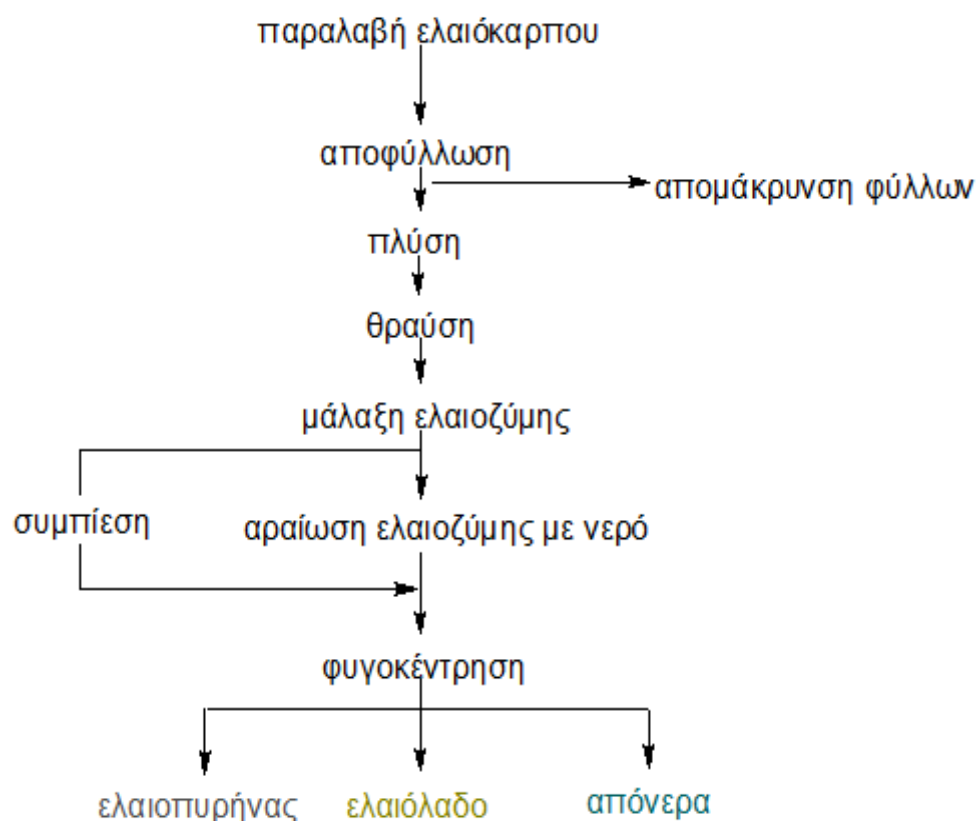
Εικόνα 1.2: Παγκόσμιος χάρτης παραγωγής ελιάς

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η Ισπανία καταλαμβάνει την πρώτη θέση στην παραγωγή ελαιόκαρπου, ακολουθεί η Ιταλία, ενώ η Ελλάδα καταλαμβάνει την τρίτη θέση στην παραγωγή ελαιόκαρπου με παραγωγή 1.666.102 t για το έτος 2012 (Εικόνα 1.3). Άλλες χώρες που παράγουν ελαιόκαρπο είναι η Τουρκία, η Αλγερία, η ΗΠΑ, η Αργεντινή κ.α. [FAOSTAT,2012].



Εικόνα 1.3: Παραγωγή ελαιόκαρπου για τις 10 πρώτες χώρες παγκοσμίως για το 2012 (FAOSTAT, 2012)

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1.4) δίνεται και το διάγραμμα παραγωγής ελαιολάδου αλλά και τα διάφορα παραγόμενα παραπροϊόντα [Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων.,2013].



Εικόνα 1.4: Διάγραμμα ροής παραγωγής ελαιολάδου

Η ελιά και το ελαιόλαδο αποτελούν κομμάτι της πολιτιστικής κληρονομιάς του Ελληνικού πολιτισμού και βασικά στοιχεία της μεσογειακής διατροφής. Η δε συσχέτιση της μεσογειακής και κρητικής διατροφής με τη χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων [Martinez Gonzalez et al., 2003, Dontas et.al, 2007] και ορισμένων μορφών καρκίνου [De Lorgeril M., 1994, Servili et al, 2009] έχει οδηγήσει στην αυξημένη ζήτηση και παραγωγή ελαιολάδου σε όλο τον κόσμο. Η πλούσια περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε πολυφαινόλες του προσδίδει αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην προστασία σοβαρών παθήσεων που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες (*oxidative stress*), όπως η νόσος του Alzheimer, του Parkinson, το σύνδρομο της χρόνιας κόπωσης και πολλές άλλες [Servili et al, 2009]. Σε μελέτες που έγιναν έχει αποδειχθεί ότι και άλλα συστατικά του ελαιόλαδου έχουν προστατευτική δράση έναντι της *in vitro* οξείδωσης της LDL χοληστερόλης. [Andrikopoulos et al., 2002].

Στην βιομηχανία τροφίμων που σχετίζεται με την επεξεργασία του ελαιόκαρπου το κύριο προϊόν είναι το ελαιόλαδο. Απόβλητα καλούνται τα δευτερογενή παραπροϊόντα, όταν δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω, ενώ όταν περιέχουν συστατικά χρήσιμα και αποτελούν αντικείμενο περαιτέρω επεξεργασίας ονομάζονται παραπροϊόντα.

Ένα από τα υγρά παραπροϊόντα της παραγωγής ελαιολάδου είναι το υγρό απόβλητο ελαιοτριβείου (*olive mill wastewater*) γνωστό και ως κασίγαρος. Το ΥΑΕ παράγεται κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου και αποτελεί πηγή ρύπανσης λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου του. Είναι ένα από τα πιο σύνθετα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα με οργανικό φορτίο 80-200 g COD/L και 63 g BOD/L [Azbar et al., 2004]. Τα περισσότερα προβλήματα που συνδέονται με το ΥΑΕ αποδίδονται στο φαινολικό του κλάσμα που είναι αρκετά δύσκολο να βιοαποικοδομηθεί. Στην πραγματικότητα, οι φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για αρκετές βιολογικές δράσεις όπως είναι η φυτοτοξικότητα [Aggelis et al., 2003; Mekki et al., 2007].

Ο κασίγαρος είναι υγρό σκούρου χρώματος (με απόχρωση από κίτρινο-πράσινο έως καφέ-μαύρο), θολό, χαρακτηριστικής οσμής, πλούσιο σε οργανικά και ανόργανα υλικά, διαλυμένα κυρίως στην υδάτινη φάση. Περιέχει κολλοειδή υλικά, πηκτίνες, ταννίνες, σάκχαρα, οργανικά οξέα, ανόργανα άλατα και υπολείμματα μαλακών φυτικών ιστών του ελαιοπολτού, που προσδίδουν στο απόβλητο τη μορφή γαλακτώματος. Το μεγαλύτερο μέρος του αποβλήτου αποτελείται από νερό. Το πιο σημαντικό, από ποσοτικής άποψης, μέρος του οργανικού κλάσματος καταλαμβάνουν τα σάκχαρα με κυριότερα τη γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη και αραβινόζη. Για αυτό το λόγο τα περιεχόμενα σάκχαρα καθιστούν τον κασίγαρο πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η περιεκτικότητα σε άζωτο είναι σχετικά χαμηλή, ενώ μικρό ποσοστό μόνο είναι πρωτεϊνικής φύσεως. Περιέχονται ακόμα, αμμωνιακό, νιτρικό και άλλης φύσεως οργανικό άζωτο. Ενδιαφέρον, αν και σε μικρότερη συγκέντρωση, παρουσιάζει η ύπαρξη οργανικών οξέων όπως το οξικό, φουμαρικό, γλυκερικό, μαλονικό, γαλακτικό, μαλικό, τρυγικό και κιτρικό, καθώς και οι πολυφαινόλες αφού προσδίδουν χαρακτηριστική υψηλή τοξικότητα. Άλλα συστατικά που εμπεριέχονται είναι πολυαλκοόλες, όπως η γλυκερίνη και η μανιλόζη, λιπαρές ουσίες καθώς και ίχνη γλυκοζιδίων και ελαιοκυανίνης. Τέλος, όσον αφορά τα ανόργανα άλατα περιλαμβάνονται κυρίως άλατα του K, φωσφορικά άλατα του Ca, άλατα Na και Mg, χλωριούχα και θειικά αλλά και βαρέα μέταλλα σε ίχνη. Τα παραπάνω άλατα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, εφόσον συνιστούν πολύτιμα λιπαντικά στοιχεία για το έδαφος [Λοϊζίδης Μ., 2009]. Τα χαρακτηριστικά του κασίγαρου συνοψίζονται παρακάτω (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1: Χαρακτηριστικά υγρού απόβλητου ελαιοτριβείου [Κώτσου Μ., 2002]

Χρώμα	Σκούρο (κίτρινο-πράσινο έως καφέ-μαύρο)
Οσμή	Έντονη
Οργανικά συστατικά	Σάκχαρα (εξόζες, πεντόζες), πολυαλκοόλες, οργανικά οξέα
Ανόργανα συστατικά	Ανόργανα οξέα, ανόργανα άλατα

Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1.2) παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις ορισμένων συστατικών του κασιίγαρου σύμφωνα με μελέτες [Zervakis and Balis., 1996].

Πίνακας 1.2: Κύρια συστατικά των ΥΑΕ [Zervakis and Balis., 1996]

Παράμετρος	Συγκέντρωση (%)	Συστατικό
Νερό	83-92	
Λίπη	0,03-1	Υπολείμματα ελαίου
Αζωτούχες ενώσεις	1,2-2,4	Γλουταμίνη, Γλυκίνη, Αργινίνη, Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη, Λυσίνη, Μεθειονίνη, Γλυκοζαμίνη κ.ά.
Σάκχαρα	2,0-8,0	Ραφινόζη, Μανόζη, Σακχαρόζη, Γλυκόζη, Αραβινόζη, Ραμνόζη, Γαλακτόζη, Ξυλόζη
Οργανικά οξέα	0,5-1,5	Οξικό, Γαλακτικό, Μηλικό, Μηλονικό, Οξαλικό, Τρυγικό, Φουμαρικό
Πολυαλκοόλες	0,5-1,5	Γλυκερίνη, Μανιτόλη
Πηκτίνες	0,4-1,5	Πηκτίνες, Ταννίνες
Ταννίνες		
Φαινολικές ενώσεις	0,3-0,8	Φλαβονοειδή: Απεγινίνη, Λουτεολίνη, Κερσετίνη Φαινόλες: Καφεϊκό, Κινναμικό, 2,6- διυδροξυβενζοϊκό, π- υδροξυβενζοϊκό, Συρινγγικό, Φερουλικό, π-κουμαρικό, Βανιλλικό, Βερατρικό, Πρωτοκατεχικό, Υδοξυτυροσόλη, Τυροσόλη,
Ανόργανα συστατικά	0,4-1,5	K, P, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Cl, S

Ο κασιίγαρος περιέχει συστατικά παρόμοια με αυτά της ελιάς τα οποία εκχυλίζονται με το νερό. Η σύστασή του δεν είναι σταθερή και εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, το στάδιο ωρίμανσης, τις περιβαλλοντικές και καλλιεργητικές συνθήκες. Ακόμα, τα παραπάνω συστατικά αλλάζουν ανάλογα με το σύστημα εξαγωγής του ελαιολάδου που χρησιμοποιείται.

Τα συστήματα παραγωγής ελαιολάδου που υπάρχουν είναι τρία, τα παραδοσιακά (υδραυλικά) πιεστήρια και τα φυγοκεντρικά που διακρίνονται σε τριφασικά και σε διφασικά. [Κώτσου Μ., 2002]

Η παραδοσιακή μέθοδος και η διαδικασία των τριών φάσεων παράγουν το ελαιόλαδο και δύο τύπους αποβλήτων: τα υγρά απόβλητα (κασιίγαρος) και τα στερεά απόβλητα (ελαιοπυρήνας). Η παραδοσιακή μέθοδος είναι μια ασυνεχής διαδικασία (*batch type process*) που διαφοροποιείται σε δύο φάσεις με την πίεση των αλεσμένων καρπών. Η υγρή φάση (μίγμα νερού/λαδιού) διαχωρίζεται προκειμένου να ληφθεί το ελαιόλαδο ως τελικό προϊόν. Αν και είναι αρκετά οικολογική μέθοδος, η τεχνική αυτή είναι ασυνεχής, γεγονός που αποτελεί μειονέκτημα για τη σύγχρονη βιομηχανία.

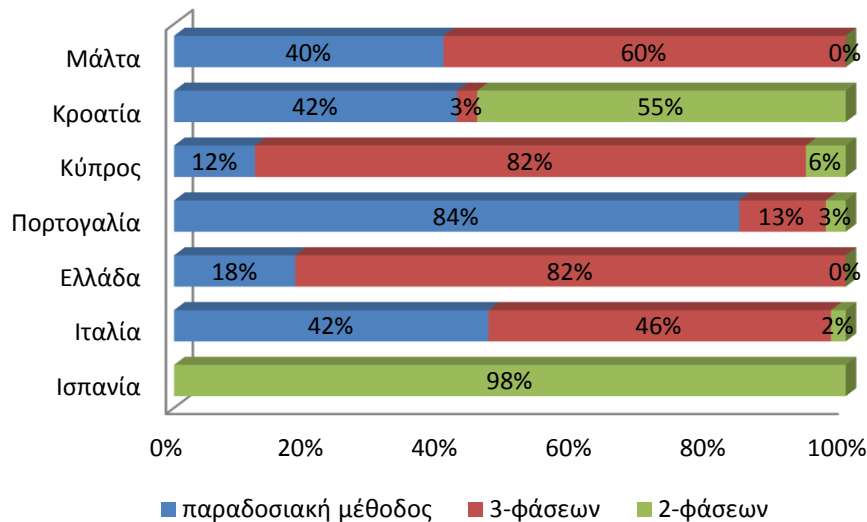
Η τριφασική διαδικασία είναι μια συνεχής διαδικασία (*continuous process*) που έχει αντικαταστήσει την παραδοσιακή μέθοδο. Οι αλεσμένοι ελαιόκαρποι τοποθετούνται σε ένα τριφασικό φυγοκεντρικό διαχωριστήρα όπου οι τρεις φάσεις (ελαιόλαδο, απόνερα, ελαιοπυρήνας) διαχωρίζονται με την επίδραση της φυγοκέντρου δυνάμεως. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι οι μεγάλες ποσότητες ύδατος που απαιτούνται και η παραγωγή υγρών αποβλήτων επιβαρυσμένων με φαινολικές ενώσεις [Lesage-Meessen et al., 2001]. Στα συστήματα δύο φάσεων τα τελικά προϊόντα είναι το ελαιόλαδο και ο ελαιοπυρήνας στον οποίο ενσωματώνονται τα απόνερα. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μειωμένη κατανάλωση νερού και η έλλειψη υγρών αποβλήτων.

Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακα 1.3) παρουσιάζονται ορισμένα από τα συστατικά των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων ανάλογα τη μέθοδο παραγωγής ελαιολάδου.

Πίνακας 1.3: Κύρια συστατικά ΥΑΕ με βάση την παραγωγική μέθοδο

Παράμετρος	Παραδοσιακή μέθοδος	Φυγοκέντρηση 3 φάσεων	Φυγοκέντρηση 2 φάσεων	Βιβλιογραφία
L ΥΑΕ/tn ελαιόκαρπου		900-1500	50-70	Aktas et al., (2001)
		500-1500		Rozzi and Malpei (1996)
	400	1000		Improlive (2000)
	400-600	1000-1200	85-110	Caputo et al., (2003)
	4,5-5	4,7-5,2		Azbar et al., (2004)
Σάκχαρα (%) (g/L)	4,5±0,3	4,8±0,3		Aktas et al., (2001)
	2-8	1		Azbar et al., (2004)
Πολυαλκοόλες (%)	2,2±1,7	4,7±1,8		Aktas et al., (2001)
Πηκτίνες/Ταννίνες (%)	1-1,5	1		Azbar et al., (2004)
Πολυφαινόλες (%)	1	0,37		Azbar et al., (2004)
	1-2,4	0,5		Azbar et al., (2004)
Λίπη και Έλαια (%)	1,7	0,63		Caputo et al., (2003)
	0,03-10	0,5-2,3		Azbar et al., (2004)

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1.5) παρουσιάζονται οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται στα Ευρωπαϊκά ελαιοτριβεία με βάση στοιχεία για το 2003 [IMPEL, 2003]. Παρατηρείται ότι, στην Ελλάδα χρησιμοποιούνται κυρίως τα συστήματα τριών φάσεων σε ποσοστό 82%.



Εικόνα 1.5: Τεχνολογίες παραγωγής ελαιολάδου στα Ευρωπαϊκά ελαιοτριβεία (IMPEL, 2003)

1.2 Μέθοδοι επεξεργασίας υγρού αποβλήτου ελαιοτριβείων

Τα ΥΑΕ έχουν υψηλό οργανικό φορτίο, αιωρούμενα στερεά και λιπίδια τα οποία παράγονται σε μεγάλες ποσότητες. Έτσι, τα απόβλητα αυτά είναι μία πηγή ανάκτησης χρήσιμων συστατικών αλλά και ικανά για περαιτέρω διαχείριση.

Διάφορες μέθοδοι επεξεργασίας, αλλά και ο συνδυασμός αυτών, έχουν αναπτυχθεί με τις κυριότερες να διακρίνονται σε φυσικές, θερμικές, φυσικοχημικές, θερμικές και βιολογικές.

1.2.1. ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι μέθοδοι που περιλαμβάνουν το διαχωρισμό φάσεων, στερεού-υγρού και υγρού-υγρού, μέσω μηχανικών διεργασιών συγκαταλέγονται στις φυσικές μεθόδους επεξεργασίας. Πιο αναλυτικά, περιγράφονται παρακάτω.

1. Καθίζηση (*sedimentation*)

Τα περισσότερα οργανικά συστατικά των ελαιουργικών αποβλήτων βρίσκονται υπό μορφή αιωρούμενων στερεών. Η μέθοδος της καθίζησης είναι μια φυσική μέθοδος επεξεργασίας, ιδανική για την απομάκρυνση των στερεών αυτών καθώς μπορεί να ελαττώσει σημαντικά το COD και το BOD στη διαλυτή φάση του αποβλήτου [Λοϊζίδης Μ., 2009]. Η διαδικασία μπορεί να είναι είτε φυσική (κατακρήμνιση λόγω βαρύτητας) είτε εξαναγκασμένη (σε φυσικό διαχωριστή ή κυκλώνα), ενώ στηρίζεται στην μεγαλύτερη πυκνότητα των μορίων από αυτή του νερού για την απομάκρυνσή τους από την υδατική φάση. Μετά την αφαίρεση των μεγαλύτερων στερεών, τα

υγρά απόβλητα ρέουν στις δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης, όπου η ταχύτητα ροής μειώνεται και τα αιωρούμενα υλικά βυθίζονται στον πυθμένα της δεξαμενής. Σε αυτό το στάδιο απομακρύνεται το 50% περίπου των διαλυμένων στερεών και το 35% του BOD₅. Ακόμα, τα συστατικά που επιπλέουν, όπως έλαια και λίπος, συλλέγονται από την επιφάνεια των δεξαμενών. Το υλικό που καθιζάνει (πρωτοβάθμια ιλύς) συλλέγεται σε μια χοάνη και οδηγείται για περαιτέρω επεξεργασία. Μερικές φορές χρησιμοποιείται ασβέστης για τον έλεγχο των οσμών, εάν είναι απαραίτητο [Μπλίκια.,2009].



Εικόνα 1.6: Δεξαμενές καθίζησης [http://www.bcua.org/WPC_VT]

II. Διήθηση (filtration)

Η διήθηση είναι μια από τις παλαιότερες μεθόδους για την απομάκρυνση των στερεών από τα υγρά απόβλητα. Όπως και με τη μέθοδο της καθίζησης, έτσι και με τη διήθηση απομακρύνονται αιωρούμενα και κolloειδή στερεά. Τα στερεά περιλαμβάνουν άργιλο και ιλύ, οργανικές ουσίες, ιζήματα από άλλες επεξεργασίες, σίδηρο, μαγγάνιο και μικροοργανισμούς. Ο διαχωρισμός γίνεται με τη βοήθεια πορώδους υλικού που συγκρατεί τα στερεά και επιτρέπει τη διέλευση της υγρής φάσης. Τα φίλτρα μπορεί να είναι στρώματα άμμου, αμμόχαλκου ή ενεργού άνθρακα που βοηθούν στην αφαίρεση και των πιο μικρών μορίων [Μπλίκια Π., 2009]. Παρόλα όμως τα υψηλά ποσοστά σε στερεά και κolloειδή των αποβλήτων, τα φίλτρα σπάνια χρησιμοποιούνται σε μικρά ελαιοτριβεία. Η διήθηση μπορεί να γίνει είτε φυσικά (με τη βαρύτητα) είτε με εφαρμογή πίεσης στην πλευρά εισόδου ή με εφαρμογή κενού στην πλευρά εξόδου των αποβλήτων. Στη βιβλιογραφία, εμφανίζονται τόσο θετικά αποτελέσματα όσον αφορά την διήθηση υπό πίεση [Niaounakis M.et al., 2004], όσο και αρνητικά. Σε έρευνα που έγινε αναφέρεται ότι

χρησιμοποιώντας φίλτρο πίεσης τα στερεά που περιέχονται στο απόβλητο, οδηγούν σε ταχύ φράξιμο καθιστώντας τη μέθοδο ακατάλληλη [Mitrakas et al., 1996].

III. Αραίωση (dilution)

Η αραίωση είναι η απλούστερη διαδικασία για τη μείωση του οργανικού φορτίου των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου. Το νερό που χρησιμοποιείται μπορεί να προέρχεται από πηγάδια, συστήματα άρδευσης ή ποταμούς. Ακόμα, ως αραιωτικό μέσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν απόβλητα με χαμηλό οργανικό φορτίο (όπως τα νερά πλύσης) αλλά και αστικά απόβλητα. Στην περίπτωση που το ρυπαντικό φορτίο των αποβλήτων είναι χαμηλό, θα μπορούσαν τα απόβλητα να οδηγηθούν σε μονάδα επεξεργασίας αστικών λυμάτων [Niaounakis M. et al., 2004]. Εάν το φορτίο είναι υψηλό τότε πρέπει να γίνει επιλογή κατάλληλης μεθόδου. Παρόλο που με τη συγκεκριμένη μέθοδο μειώνεται το οργανικό φορτίο των αποβλήτων, απαιτούνται σημαντικές ποσότητες νερού για την αραίωση, καθιστώντας την έτσι ακατάλληλη σε περιοχές με περιορισμένες πηγές νερού [Ντόλια Σ., 2006].

IV. Επίπλευση (flotation)

Η επίπλευση είναι μια φυσική μέθοδος διαχωρισμού αιωρούμενων στερεών από τα υγρά απόβλητα και έχει εφαρμογή σε πολλά είδη βιομηχανικών αποβλήτων. Η μέθοδος βασίζεται στη διοχέτευση αερίου (αέρα ή μίγμα αέρα και CO₂) υπό πίεση στο απόβλητο σχηματίζοντας έτσι λεπτές φυσαλίδες οι οποίες προσκολλώνται στο λάδι και στα στερεά παρασύροντάς τα. Δύο είναι οι βασικοί τύποι επίπλευσης και διακρίνονται ως προς τον τρόπο που παράγονται οι φυσαλίδες, η επίπλευση διαλυμένου και διασκορπισμένου αέρα. Στον πρώτο τύπο επίπλευσης οι φυσαλίδες του αέρα είναι μικρότερες από τα σωματίδια που πρέπει να διαχωριστούν ενώ στην δεύτερη οι φυσαλίδες είναι μεγαλύτερες [Λοϊζίδης Μ., 2009]. Η επίπλευση με διαλυμένο αέρα (Dissolved Air Flotation), η οποία αναφέρεται και σαν επίπλευση πίεσης, είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη λόγω της ικανότητάς της στην απομάκρυνση μεγάλου εύρους στερεών [Μπλίκια Π., 2009].

1.2.2. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι μέθοδοι επεξεργασίας των ΥΑΕ που βασίζονται στη χρήση χημικών προσθέτων συγκαταλέγονται στις φυσικο-χημικές μεθόδους. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η εξουδετέρωση, η προσρόφηση και η χημική οξείδωση.

I. Εξουδετέρωση (neutralization)

Στόχος της εξουδετέρωσης είναι η εξισορρόπηση των ιόντων υδρογόνου ή των ιόντων υδροξυλίου στο διάλυμα με σκοπό το ιονικό δυναμικό του καθενός να είναι ίσο. Συνήθως η αποσταθεροποίηση των κολλοειδών σωματιδίων των υγρών

αποβλήτων επιτυγχάνεται με διάλυμα $\text{Ca}(\text{OH})_2$ σε $\text{pH}=11$ είτε με διάλυμα H_2SO_4 $\text{pH}=2-4$, όπου παρατηρείται επιτάχυνση της υδρόλυσης [Mitrakas et al., 1996].

II. Προσρόφηση (adsorption)

Η προσρόφηση είναι η φυσική σύνδεση αερίων ή διαλυμένων συστατικών (απορροφήσιμα) στην επιφάνεια των στερεών ουσιών (ροφητικά). Η διαδικασία της ρευστοποιημένης κλίνης, όπου η ροφητική σκόνη ανακατεύεται με το απόβλητο αλλά και η διαδικασία της σταθερής μεμβράνης όπου το απόβλητο ρέει κατά μήκος του ροφητικού, χρησιμοποιούνται για εντατικοποίησης της διαδικασίας μεταφοράς των διαλυμένων συστατικών. Ο ενεργός άνθρακας είναι ένα από τα πιο χρησιμοποιούμενα ροφητικά μέσα λόγω της μεγάλης εσωτερικής του επιφάνειας και της υψηλής ροφητικής του ικανότητας. [Ντόλια Σ., 2006]. Η προσρόφηση εφαρμόζεται στις παρακάτω περιπτώσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων: εξάλειψη χρώματος ή γεύσης, οσμών, ανάκτηση διαλυτών, καθαρισμός των αποβλήτων, απομάκρυνση τοξικών ουσιών από τα απόβλητα (όπως φυτοφάρμακα, φαινόλες, κλπ) [Μπλικά Π., 2009].

III. Οξείδωση (oxidation)

Αρκετές τοξικές ουσίες που εμπεριέχονται στα υγρά απόβλητα μπορούν να καταστραφούν μέσω αντιδράσεων οξείδωσης. Τα οξειδωτικά μέσα που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το οξυγόνο, παράγωγα οξυγόνου όπως όζον και υπεροξειδίο του υδρογόνου, το χλώριο και τα παράγωγά του. Η χρήση όζοντος ή υπεροξειδίου του υδρογόνου σε συνδυασμό με υπεριώδη ακτινοβολία UV δημιουργεί προϋποθέσεις ισχυρότερης χημικής οξείδωσης λόγω της παραγωγής ριζών υδροξυλίου που αποτελούν τα πλέον γνωστά οξειδωτικά σώματα μετά τις ρίζες φθορίου. Ο συνδυασμός αυτός ανήκει σε ειδικές μεθόδους οξείδωσης γνωστές και ως Προωθημένες Μέθοδοι Οξείδωσης (AOP, *Advanced Oxidation Processes*) [Λοϊζίδης Μ., 2009].

Ορισμένες από τις μεθόδους αυτές είναι οι εξής:

- Φωτόλυση O_3 (οζονόλυση)
- Φωτόλυση H_2O_2
- Φωτοκατάλυση
- Αντιδράσεις Fenton
- Υγρή οξείδωση
- Ηλεκτροχημική οξείδωση

Αναφορά γίνεται και σε άλλες μεθόδους επεξεργασίας όπως η χημική κατακρήμνιση (*chemical precipitation*), η προσρόφηση με ιοντοανταλλαγή (*ion exchange*) και οι διεργασίες μεμβρανών [Λυμπεράτος κ.ά., 2012].

1.2.3. ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι θερμικές διεργασίες που διατίθενται για επεξεργασία υγρών αποβλήτων διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες και όλες έχουν έναν κοινό παρανομαστή: προσπαθούν να συμπυκνώσουν τα απόβλητα, απομακρύνοντας το περιεχόμενο νερό, με σκοπό την ελάττωση του όγκου τους. Οι παραπάνω κατηγορίες είναι: οι φυσικοθερμικές μέθοδοι που περιλαμβάνουν την εξάτμιση και την απόσταξη, οι μη αντιστρεπτές χημικοθερμικές μέθοδοι που περιλαμβάνουν την καύση και την πυρόλυση και τέλος ο συνδυασμός των παραπάνω μεθόδων.

1. Φυσικο-θερμικές μέθοδοι

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν την εξάτμιση και την απόσταξη κατά τις οποίες παράγονται δύο προϊόντα: ένα πτητικό προϊόν που περιλαμβάνει υγρό ατμό και πτητικές ουσίες και ένα συμπυκνωμένο διάλυμα. Αυτές οι διεργασίες επιτυγχάνουν μεγάλη μείωση του COD και του BOD₅ αλλά συνήθως απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο για την ολοκλήρωση της επεξεργασίας.

Η ενέργεια για την εξάτμιση προέρχεται από θερμότητα καύσης ή από φυσική πηγή (ήλιος). Ένα από τα μειονεκτήματα αυτών των διαδικασιών σχετίζεται με την επεξεργασία και τη διάθεση των προϊόντων που προκύπτουν, όπως η διάθεση των ημι-στερεών υπολειμμάτων. Τα υπολείμματα αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή, αλλά η χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω της έντονης γεύσης και της υψηλής περιεκτικότητας σε κάλιο [Rozzi et al., 1996].

Ακόμα, τα στερεά υπολείμματα έχουν υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο που χρησιμοποιείται συχνά για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Ο συμπυκνωμένος ατμός από την έξοδο της τουρμπίνας μεταφέρεται στο λέβητα και χρησιμοποιείται ως κινητήριος δύναμη για τις μηχανές. Μετά την ξήρανση του νερού το στερεό υπόλειμμα μπορεί να αποτεφρωθεί και να συμβάλει στην παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας ή ακόμα το συμπύκνωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα. Γενικότερα, οι απαιτήσεις σε ενέργεια είναι αρκετά υψηλές όπως και τα έξοδα συντήρησης λόγω της ανάγκης περιορισμού των επικαθήσεων σακχάρων και ασβεστίου στους εξατμιστές [Ντόλια Σ., 2006].

II. Χημικο-θερμικές

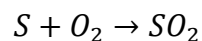
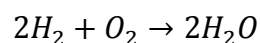
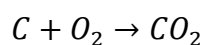
Η καύση και η πυρόλυση ανήκουν στις μη αντιστρεπτές χημικο-θερμικές μεθόδους. Και οι δυο τεχνικές χρησιμοποιούνται για την αποδόμηση τόσο των συμπυκνωμάτων των ΥΑΕ όσο και για τον πυρήνα. Είναι καταστροφικές μέθοδοι επεξεργασίας και έτσι αποκλείουν περαιτέρω χρήση του υγρού αποβλήτου. Λόγω της εκπομπής τοξικών αέριων τοξικών ρύπων απαιτούν μεγάλη κατανάλωση ενέργειας, ακριβά συστήματα καύσης/πυρόλυσης αλλά και πρόσθετη ενέργεια για τη μεταφορά των αποβλήτων από το ελαιοτριβείο στο χώρο αποτέφρωσης [Ντόλια Σ., 2006].

Καύση (incineration)

Καύση ονομάζεται η θερμική οξείδωση παρουσία περίσσειας οξυγόνου. Κατά την αντίδραση του υποστρώματος με το οξυγόνο παράγονται διοξείδιο του άνθρακα, νερό και θερμότητα. Όσον αφορά τα στερεά απορρίμματα η καύση αποτελεί μία ελκυστική μέθοδο επεξεργασίας, αφού μπορεί να μειώσει τον όγκο των τους κατά 85-95%, παράγοντας παράλληλα ενέργεια. Όμως στην περίπτωση των ΥΑΕ το πρόβλημα είναι ότι αυτά περιέχουν 80-83% νερό και επομένως αδυνατούν να συντηρήσουν την καύση χωρίς προηγουμένως να ξηραθούν. Επομένως, είναι κατάλληλη η μέθοδος για συμπυκνωμένα απόβλητα. Άλλο πρόβλημα είναι η εποχική αναγκαιότητα λειτουργίας του καυστήρα. Εάν ο καυστήρας λειτουργεί όλο το έτος τότε πρέπει να τροφοδοτείται και με άλλα καύσιμα. [Λυμπεράτος κ.ά., 2012].

Ο έλεγχος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης που προκαλεί παραμένει ωστόσο το βασικό πρόβλημα της μεθόδου, παρά την ανάπτυξη της σχετικής τεχνολογίας κατά τα τελευταία χρόνια.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την καύση είναι: [Βλυσίδης κ.ά., 2014]



Πυρόλυση (craking)

Πυρόλυση είναι η θερμική αποδόμηση οργανικής ύλης απουσία οξυγόνου και σε θερμοκρασίες 250-1000 °C ανάλογα το επιθυμητό προϊόν. Η πυρόλυση χρησιμοποιείται κυρίως σε συμπυκνώματα των ΥΑΕ ή και σε ελαιοπυρήνα. Αποτελείται από μια σειρά πολύπλοκων χημικών αντιδράσεων, οι οποίες διασπούν την οργανική ύλη [Λυμπεράτος κ.ά., 2012].

1.2.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι βιολογικές διεργασίες βασίζονται στη χρήση μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση των οργανικών ενώσεων που περιέχονται στο ΥΑΕ. Το είδος των μικροοργανισμών που χρησιμοποιείται εξαρτάται από τις συνθήκες συγκέντρωσης του οξυγόνου που επικρατούν κατά τις βιολογικές διεργασίες. Έτσι, οι βιολογικές διεργασίες χωρίζονται σε αναερόβιες και αερόβιες. Πιο αναλυτικά περιγράφονται παρακάτω.

1. Αναερόβια επεξεργασία (anaerobic treatment)

Ως αναερόβια χώνευση ορίζεται η βιολογική διεργασία κατά την οποία το οργανικό υλικό μετατρέπεται σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα με τη χρήση βακτηρίων απουσία οξυγόνου. Η αναερόβια επεξεργασία αποτελεί κατάλληλη μέθοδο για την απομάκρυνση του οργανικού φορτίου από ιδιαίτερα μολυσμένα υγρά απόβλητα. Είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την σταθεροποίηση της παραγόμενης ιλύος στις μονάδες βιολογικής επεξεργασίας αστικών λυμάτων και υγρών βιομηχανικών αποβλήτων αλλά και για την επεξεργασία του οργανικού κλάσματος των αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων.

Η αναερόβια διεργασία αποτελείται από τέσσερις κύριες διεργασίες: την διαλυτοποίηση του οργανικού κλάσματος (υδρόλυση), την παραγωγή λιπαρών οργανικών οξέων (οξυγένεση ή οξεογένεση), την παραγωγή υδρογόνου και οξικού οξέος (οξικογένεση) και την παραγωγή μεθανίου (μεθανογένεση). Κατά την υδρόλυση, ένα σύμπλεγμα βακτηρίων διασπούν τα οργανικά μακρο-μόρια (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια) σε διαλυτά μονομερή μόρια όπως σε αμινοξέα, απλά σάκχαρα και σε λιπαρά οξέα τα οποία προχωρούν στο επόμενο στάδιο. Η υδρόλυση λαμβάνει χώρα από εξω-κυτταρικά υδρολυτικά ένζυμα, που παράγουν τα υδρολυτικά-οξυγενή βακτήρια, όπως είναι οι κυτταρινάσες, οι πρωτεϊνάσες και οι λιπάσες. Η οξυγένεση περιλαμβάνει διεργασίες ζύμωσης και αναερόβιας οξειδωσης (β- οξείδωση), η οποία πραγματοποιείται από οξικογενή βακτήρια. Τα οξικογενή βακτήρια μετατρέπουν τα λιπαρά οξέα και τις αλκοόλες σε οξικό οξύ, σε υδρογόνο και σε διοξείδιο του άνθρακα τα οποία χρησιμοποιούνται από τα μεθανογενή βακτήρια για την παραγωγή μεθανίου στη διαδικασία της μεθανογένεσης.

Η αποδοτικότητα της αναερόβιας χώνευσης λόγω ότι είναι μια σύνθετη μικροβιολογική διεργασία, καθορίζεται από του εξής παράγοντες:

- Χρόνος παραμονής
- Επαφή μεταξύ βακτηρίων και υποστρώματος
- Κατάλληλο pH και θερμοκρασία

- Συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών
- Συγκέντρωση τοξικών ουσιών [Βλυσιδης κ.ά., 2014]

Η αναερόβια επεξεργασία των αποβλήτων εφαρμόζεται όλο και περισσότερο και για παραγωγή ενέργειας. Αυτό οφείλεται στο ότι η διεργασία παράγει μεθάνιο, μικρές ποσότητες μικροβιακής μάζας και ιλύος αλλά και έχει μικρές απαιτήσεις σε υποστρώματα [Βλυσιδης κ.ά., 2014]. Ωστόσο, η παραγωγή μεθανίου συχνά παρεμποδίζεται στη βιολογική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων καθώς οι υψηλές συγκεντρώσεις COD και BOD₅ (πάνω από 7 g/L), η παρουσία πολυφαινολών και λιπαρών οξέων στα υγρά απόβλητα προκαλούν αστάθεια στο μεταβολισμό των μικροοργανισμών και συμβάλλουν στη συσσώρευση πτητικών λιπαρών οξέων [Rozzi et al., 1996].

II. Αερόβια επεξεργασία (*aerobic treatment*)

Η αερόβια βιολογική επεξεργασία των ΥΑΕ βασίζεται στη χρήση αερόβιων μικροοργανισμών, την παροχή ικανοποιητικής ποσότητας οξυγόνου και θρεπτικών. Η σύσταση των αποβλήτων ελαιοτριβείου σε ανόργανα άλατα και πηγές άνθρακα το καθιστούν ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να παράγουν χρήσιμα προϊόντα και να μειώσουν το οργανικό φορτίο των αποβλήτων. Οι αερόβιες τεχνολογίες περιλαμβάνουν:

Βιοφίλτρα (*biofilter*)

Τα βιοφίλτρα είναι δεξαμενές γεμάτες με πληρωτικό υλικό μεγάλης ειδικής επιφάνειας, όπου οι μικροοργανισμοί ακινητοποιούνται φτιάχνοντας ένα βιολογικό υμένιο (*biofilm*). Οι μικροοργανισμοί τρέφονται με τα οργανικά συστατικά που περιέχει το υγρό απόβλητο, το οποίο διασκορπίζεται με τη βοήθεια περιστροφικού εκτοξευτή στη κορυφή και έπειτα ρέει μέσα από το βιοφίλτρο. Η απόδοση του βιοφίλτρου εξαρτάται από την συνολική επιφάνεια επαφής των μικροοργανισμών με το υγρό απόβλητο καθώς και από την τροφοδοσία με διαλυμένο οξυγόνο στις βιολογικές διεργασίες. Το εκρέον υλικό από τα φίλτρα συλλέγεται στον πυθμένα του βιοφίλτρου και μεταφέρει ζωντανούς, νεκρούς οργανισμούς και παραπροϊόντα από τις βιολογικές διεργασίες [Βλυσιδης κ.ά., 2014]

Συστήματα ενεργού ιλύος (*activated sludge*)

Η διεργασία ενεργού ιλύος περιλαμβάνει μια δεξαμενή αερισμού, στην οποία γίνεται η βιολογική οξειδωση των οργανικών και μια δεξαμενή καθίζησης στην οποία καθιζάνουν οι μικροοργανισμοί. Αυτοί με τη σειρά τους τρέφονται και αναπτύσσονται πάνω σε ένα οξειδωμένο υπόστρωμα στα υγρά απόβλητα, σχηματίζοντας έτσι ένα αιώρημα από ενεργοποιημένη ιλύ στο νερό. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, βακτηρίων και μυκήτων, συνοδεύεται και από παραγωγή μεταβολικών προϊόντων όπως, CO₂, NO₃⁻, SO₄⁻². Το μίγμα του υγρού αποβλήτου και

της λάσπης καθιζάνει και διαχωρίζεται σε ενεργοποιημένη λάσπη και επεξεργασμένο νερό. Συνήθως, τα ΥΑΕ αραιώνονται κατάλληλα με βιοαποικοδομήσιμα υγρά απόβλητα με σκοπό την αραιώση των βιοτοξικών ουσιών που περιέχονται στα απόβλητα ελαιουργείου [Βλυσίδης κ.ά., 2014]

Βιοδίσκοι (*Rotating Biological Contactor, RBC*)

Οι βιοδίσκοι είναι αντιδραστήρες φίλτρου, μία παραλλαγή των βιοφίλτρων. Στους βιοδίσκους οι μικροοργανισμοί ακινητοποιούνται σε περιστρεφόμενους δίσκους οι οποίοι είναι μερικώς βυθισμένοι στο απόβλητο με ουδέτερο pH και καθώς περιστρέφονται, η βιομάζα έρχεται σε επαφή διαδοχικά με το απόβλητο και έπειτα με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Έτσι επιτυγχάνεται τόσο η μείωση του οργανικού φορτίου του αποβλήτου όσο και η ικανοποιητική οξυγόνωση της βιομάζας. Τα συστήματα αυτά, από οικονομικής άποψης, δεν συμφέρουν όταν πρέπει να διαχειριστούν είτε μεγάλα υδραυλικά φορτία είτε μεγάλα οργανικά φορτία [Ντόλια Σ., 2006].

Αερόβιοι Αντιδραστήρες διαλείποντος έργου (*Sequencing Batch Reactors, SBR*)

Τα συστήματα SRB είναι μία παραλλαγή του συστήματος ενεργού ιλύος όμως οι διάφορες επί μέρους λειτουργίες του, στην περίπτωση των SBR, γίνονται σταδιακά με κάποια ακολουθία και σε διαλείπον έργο. Αρχικά, γίνεται αφαίρεση των μεγάλων σωματιδίων από το απόβλητο. Μέσα στο αντιδραστήρα αντλείται αέρας για την ικανοποιητική παροχή οξυγόνου και για να επιτευχθεί αερόβια διαδικασία. Οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν, με τη βοήθεια του οξυγόνου, το οργανικό υλικό του αποβλήτου που έχει απομείνει. Ακολουθεί αερισμός και το απόβλητο αφήνεται σε ηρεμία. Έπειτα, το επεξεργασμένο πλέον ρεύμα εκροής, καθώς και ένα μέρος της λάσπης που έχει καθιζάνει, αφαιρούνται. Ο χρόνος της διεργασίας εξαρτάται από τη σύσταση του αποβλήτου καθώς και την κατάσταση λειτουργίας του συστήματος. Μεγαλύτερος χρόνος παραμονής σημαίνει μικρότερη παραγωγή ιλύος και καθαρότερου ρεύματος εκροής.

Το κύριο πλεονέκτημα των SBR είναι ότι με τα συστήματα αυτά μπορεί να επιτευχθούν πολύ μικρές συγκεντρώσεις οργανικού φορτίου στην έξοδο και ενδείκνυται η εφαρμογή τους όταν η απαιτήσεις εξόδου του επεξεργασμένου αποβλήτου είναι πολύ συγκεκριμένες. Ακόμα, απαιτείται μικρότερη έκταση γης από τα αντίστοιχα συστήματα ενεργού ιλύος και είναι εύκολο να επεκταθεί το σύστημα αυτό με την προσθήκη επιπλέον αντιδραστήρων. Όμως, τα συστήματα αυτά είναι πιο πολύπλοκα στη λειτουργία τους και έχουν μικρότερες δυνατότητες ελέγχου όταν υπάρχουν συνεχείς μεταβολές του οργανικού φορτίου του εισερχόμενου αποβλήτου.

Γενικά, η αερόβια βιολογική επεξεργασία των ΥΑΕ παρουσιάζει λιγότερο ενδιαφέρον εξ' αιτίας των μεγάλων ενεργειακών απαιτήσεων λόγω των απαιτήσεων παροχής οξυγόνου, των αναγκών σε θρεπτικά συστατικά, του υψηλού κόστους των εγκαταστάσεων, της εποχιακής μεταβαλλόμενης απόδοσης λόγω μεταβολής της θερμοκρασίας καθώς και της υψηλής παραγωγής δευτερογενούς λάσπης η οποία πρέπει να διατεθεί [Ντόλια Σ., 2006].

1.3 Ισχύουσα νομοθεσία για τη διάθεση των αποβλήτων των ελαιουργείων

Η σημαντικότερη ελληνική νομοθεσία που αφορά τα ελαιοτριβεία είναι η εξής:

ΥΥΠ&ΚΑ με αρ. ΥΜ/5784/23-1-1992, όπως τροποποιήθηκε από τη αρ.

4419/23-10-1992

- I. ΝΟΜΟΣ ΥΠ. ΑΡΙΘΜ. 2516/97: «Ίδρυση και λειτουργία βιομηχανικών και βιοτεχνικών εγκαταστάσεων και άλλες διατάξεις» (ΦΕΚ 159/Α/8-8-97). Σύμφωνα με το άρθρο 1 και με βάση την κινητήρια εγκατεστημένη ισχύ που είναι πάνω από 16 HP, τα ελαιοτριβεία νοούνται ως Βιομηχανία ή Βιοτεχνία. Στο άρθρο 18, παράγραφος 2, αναφέρεται ότι : «Για την χορήγηση νέας άδειας λειτουργίας αόριστης χρονικής ισχύος απαιτείται να έχει εξασφαλιστεί προηγουμένως η πλήρη συμμόρφωση των φορέων προς τις κείμενες διατάξεις περί προστασίας του περιβάλλοντος και υγιεινής των εργαζομένων και περιοίκων....».
- II. ΚΥΑ 69269/5387/90: «Κατάταξη έργων και δραστηριοτήτων σε κατηγορίες, περιεχόμενο μελέτης περιβαλλοντικών επιπτώσεων, καθορισμός περιεχομένου ειδικών περιβαλλοντικών μελετών και λοιπές συναφείς διατάξεις, σύμφωνα με τον Ν. 1650/86» (ΦΕΚ 678Β/25-10-90).
- III. ΚΥΑ 10537/93: «Καθορισμός αντιστοιχίας της κατάταξης των βιομηχανικών – βιοτεχνικών δραστηριοτήτων της ΚΥΑ 69269/90 με την αναφερόμενη στις πολεοδομικές ή άλλες διατάξεις διάκριση των δραστηριοτήτων σε χαμηλή, μέση και υψηλή όχληση» (ΦΕΚ 139Β/11-3-93). Σύμφωνα με το άρθρο 1, τα ελαιοτριβεία κατατάσσονται στις δραστηριότητες χαμηλής όχλησης.

ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ Ε1β/221 (ΦΕΚ 138/Β/24-12-1965):

«Περί διαθέσεως λυμάτων και βιομηχανικών αποβλήτων». Η Διάταξη αυτή του Υπουργείου Υγείας και Πρόνοιας, θέτει ουσιαστικά τα πλαίσια μέσα στα οποία πρέπει να κινούνται οι βιομηχανίες όσο αφορά την επεξεργασία και διάθεση των αποβλήτων τους. Στο άρθρο 1 δίνονται οι ορισμοί των «λυμάτων», «βιομηχανικών αποβλήτων», «επεξεργασίας» κ.α. Το άρθρο 2 αναφέρεται με γενικούς όρους όσον αφορά στην διάθεση των λυμάτων και στα άρθρα 3 και 4 παρουσιάζονται τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχουν τα επιφανειακά και τα θαλάσσια νερά ανάλογα με τις χρήσεις τους. Στην συνέχεια στα άρθρα 7 και 8 θέτονται οι όροι για τη διάθεση των λυμάτων και των βιομηχανικών αποβλήτων στο έδαφος και στο υπέδαφος. Τα άρθρα 9 έως 13 αναφέρονται στους όρους και στις μεθόδους που πρέπει να τηρούν και να ακολουθούν μεμονωμένες μονάδες (κατοικίες, σχολεία, ξενοδοχεία, κ.α.) κατά την επεξεργασία των λυμάτων τους. Τέλος, στα άρθρα 14, 15 και 16 καθορίζονται ο τρόπος και οι απαιτήσεις για την αδειοδότηση της διάθεσης λυμάτων ή βιομηχανικών αποβλήτων, η ισχύς της Διατάξεως και οι κυρώσεις και επίσης δίνονται μεταβατικές διατάξεις για τις υφιστάμενες εγκαταστάσεις διαθέσεως των λυμάτων και μέθοδοι εξετάσεως βιομηχανικών αποβλήτων ή υδάτων.

Μια σημαντική οδηγία εφαρμογής της Υ.Δ. Ε1β/221 που κοινοποιήθηκε με την εγκύκλιο του **ΥΚΥ με αριθμό Α5/4690/ΕΓΚ.62/26-4-80**, αναφέρει τους όρους για τη χορήγηση άδειας διαθέσεως λυμάτων ή βιομηχανικών αποβλήτων, τον τρόπο ανανέωσης προσωρινής άδειας διαθέσεως τους και στοιχεία για τον έλεγχο αποδόσεως των εγκαταστάσεων επεξεργασίας. Στο παράρτημα 1 της Οδηγίας υπάρχει ενδεικτικός πίνακας με τα προτεινόμενα χαρακτηριστικά ποιοτικών παραμέτρων, για τον έλεγχο των βιομηχανικών αποβλήτων κατά κλάδο και είδος βιομηχανίας. Έτσι στην κατηγορία *Βρώσιμα Λίπη και Έλαια του κλάδου Τροφών και Ποτών*, οι τακτικοί ποιοτικοί παράμετροι που πρέπει να εξετάζονται είναι το BOD_5 , και το COD , τα αιωρούμενα στερεά, τα διαλυμένα στερεά, τα λίπη, τα έλαια και το pH ενώ οι συμπληρωματικοί παράμετροι είναι το N , ο P , τα θειικά και τα θειούχα κατά περίπτωση.

Διαχείριση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (ΥΑΕ)

Η διαχείριση των ΥΑΕ δεν διέπεται από συγκεκριμένες νομοθετικές οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα απόβλητα αυτά παράγονται ως επί το πλείστον σε χώρες της Μεσογείου. Η **Κοινοτική Οδηγία 91/271/ΕΕC** με θέμα «Επεξεργασία των αστικών υγρών αποβλήτων» αφορά μόνο στην προστασία του περιβάλλοντος από τις επιβλαβείς επιπτώσεις λόγω διάθεσης αστικών και αγροτικών αποβλήτων. Άρα, είναι απαραίτητη η κατάλληλη επεξεργασία των υγρών αποβλήτων πριν την διάθεσή τους σε υδατικούς αποδέκτες και μόνο σε περίπτωση

προ-επεξεργασίας υπάρχει η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης τους [Zaharaki and Komnitsas.,2009].

Σήμερα, οι πρακτικές διαχείρισης των ΥΑΕ περιλαμβάνουν διάθεση στο έδαφος, σε κοντινούς ποταμούς, λίμνες ή θάλασσες και αποθήκευση/εξάτμιση σε ειδικές δεξαμενές, προκαλώντας ωστόσο προβλήματα όπως η ρύπανση των υδατικών πόρων. Παρόλα αυτά, έρευνες έχουν δείξει ότι η παρουσία οργανικής ύλης και ανόργανων συστατικών στα εδάφη πιθανόν να εμποδίζει το φαινόμενο της διάβρωσης και ευνοεί τη γονιμότητα του εδάφους [Rinaldi et al., 2003, Kapellakis et al., 2008]. Οι άδειες λειτουργίας των ελαιοτριβείων χορηγούνται υπό την προϋπόθεση εφαρμογής κατάλληλων μεθόδων διαχείρισης των υγρών αποβλήτων, ανάλογα με τη γεωγραφική διασπορά των ελαιοτριβείων καθώς και του μεγέθους τους [Paraskeva and Diamadoroulos.,2006].

Το πιο σημαντικό βήμα που έχει γίνει μέχρι σήμερα στην ελληνική νομοθεσία για τα Απόβλητα των Ελαιοτριβείων, αποτελεί η εγκύκλιος του **ΥΠ&ΚΑ με αρ. ΥΜ/5784/23-1-1992 και αρ. 4419/23-10-1992**. Αυτή η εγκύκλιος αναφέρει αναλυτικά: «Έχοντας υπόψη τα προβλήματα που δημιουργούνται στο περιβάλλον από τη διάθεση των αποβλήτων των ελαιοτριβείων», σας γνωρίζουμε τα εξής:

1. Η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων με χημική μέθοδο (εξουδετέρωση με υδράσβεστο και χημική κροκίδωση) αποτελεί μια μέθοδο μείωσης του οργανικού και χημικού ρυπαντικού φορτίου, για χαμηλά όμως ποσοστά. Ακόμα και με πλήρη σχεδόν απόδοση των εγκαταστάσεων δεν προσεγγίζει τα επιθυμητά επίπεδα, όπως προβλέπεται από την **Υ.Δ.Ε1β/221/65** και τις σχετικές εγκυκλίου.
2. Η προαναφερόμενη μέθοδος είναι μια κλασσική και ευρέως διαδεδομένη μέθοδος μείωσης της ρύπανσης, πλην όμως υπάρχουν και άλλες παραλλαγές αυτής ή και συμπληρωματικές (π.χ. διάφορα κροκιδωτικά υλικά, συνδυασμός με αναερόβια βιολογική επεξεργασία κ.λ.π). Επειδή πρόκειται για επιβαρυνμένα και δύσκολα στο χειρισμό απόβλητα, θα πρέπει η επιλεγόμενη μέθοδος επεξεργασίας, πέραν της υψηλής αποδοτικότητας και λειτουργικότητας, να είναι και τεχνικό – οικονομικώς συμφέρουσα στις μικρές επιχειρήσεις (ελαιοτριβεία). Στα πλαίσια αυτά στρέφονται και οι ερευνητικές μελέτες που έγιναν και γίνονται και που οπωσδήποτε τα αποτελέσματα θα συνεκτιμηθούν και θα γίνουν οι ανάλογες νομοθετικές ρυθμίσεις (εγκύκλιοι, τροποποιήσεις Υγειονομικών Διατάξεων κ.λ.π).
3. Ο τελικός αποδέκτης των επεξεργασμένων αποβλήτων θα καθορίζεται πάντοτε στα πλαίσια της **Υ.Δ.Ε1β/221/65 και της εγκυκλίου με αρ. οικ. ΥΜ 2985/29-5-91** και οπωσδήποτε θα λαμβάνονται υπόψη οι τοπικές συνθήκες.

Η θάλασσα και γενικότερα οι υδάτινοι αποδέκτες θα πρέπει να αποφεύγονται και αποτελούν μόνο την αναπόφευκτη λύση, αφού αποκλεισθούν όλες οι άλλες δυνατότητες τελικής διάθεσης (υπεδάφιας, επιφανειακά στο έδαφος κ.λ.π).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι είναι επιτακτική ανάγκη η εύρεση μεθόδου επεξεργασίας που να είναι αποδοτική ως προς τη μείωση του οργανικού φορτίου και ρυπαντών, αλλά και οικονομικά συμφέρουσα ταυτόχρονα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

2.1 Εισαγωγή

Από την αρχαιότητα τα μανιτάρια (*fungi, fungus*) χρησιμοποιήθηκαν για τροφή και φαρμακευτικούς σκοπούς. Σήμερα, καλλιεργούνται σε βιομηχανική κλίμακα ως τρόφιμα και αποτελούν αντικείμενο έρευνας για παραγωγή ενζύμων, φαρμάκων και άλλων χρήσιμων ουσιών. Η ικανότητά τους να αποικοδομούν πολύπλοκες οργανικές ενώσεις, λόγω των ενζύμων που παράγουν, έχει οδηγήσει σήμερα στη χρήση τους για τη βιολογική επεξεργασία αποβλήτων.

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί και χωρίζονται σε τρεις ομάδες, τους Ασκομύκητες, τους Ζυμομύκητες και τους Βασιδιομύκητες. Ζουν τόσο σε υδάτινο περιβάλλον (γλυκό νερό και θάλασσα) όσο και στο έδαφος, σε φυτικά και ζωικά υπολείμματα. Οι μύκητες είναι οργανισμοί ετερότροφοι, αφού τρέφονται με υπάρχουσες οργανικές ενώσεις. Ένας τυπικός μύκητας αποτελείται από υφές, δηλαδή μία μάζα διακλαδισμένων, κυλινδρικών νηματίων. Το σύνολο των υφών ονομάζεται μυκήλιο, το οποίο αποτελεί το θαλλό του μύκητα. Οι υφές μπορεί να είναι συνεχείς, 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 [Δρίτσα, 2006].

Τα κύτταρά τους, όπως και των φυτικών κυττάρων περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα με κύριο συστατικό τη χιτίνη (ένα πολυμερές που συνθέτει και τον εξωσκελετό των εντόμων). Τέλος οι περισσότεροι μύκητες, έχουν την ιδιότητα να αναπαράγονται και να πολλαπλασιάζονται με ειδικές αναπαραγωγικές μονάδες, τα σπόρια, τα οποία κατά κανόνα σχηματίζονται από εξειδικευμένα αναπαραγωγικά όργανα.

Σε μελέτες που έγιναν, ο αριθμός των αναγνωρισμένων μυκήτων ανέρχεται σε 72.065 είδη. Από αυτά τα είδη, το 44,7% αποτελούν οι Ασκομύκητες, το 30,8% οι Βασιδιομύκητες, το 19,5% οι Δευτερομύκητες και οι Ζυγομύκητες μόλις το 1,46% [Καψανάκη-Γκότση., 2000].

Πίνακας 2.1: Ταξινόμηση μυκήτων [Δρίτσα.,2006]

Είδος	Κοινή ονομασία	Αντιπροσωπευτικό γένος	Τύπος σπορίων	Περιβάλλον
Ασκομύκητες (Ascomycetes)	Μύκητας	<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
Δευτερομύκητες (Deuteromycetes)	Ατελείς μύκητες	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Candida</i>	Άγνωστο	Έδαφος, φυτικό υλικό σε αποσύνθεση, επιδερμίδα ζώων
Ωομύκητες (Oomycetes)	Μούχλες νερού	<i>Allomyces</i>	Ωοσπόριο	Υδατικό μέσο
Ζυγομύκητες (Zygomycetes)	Μούχλες ψωμιού	<i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i>	Ζυγοσπόριο	Έδαφος, φυτικό υλικό σε αποσύνθεση

Κύριο ρόλο στην αποικοδόμηση των λιγνινοκυτταρινούχων ενώσεων, που εμπεριέχονται στα ΥΑΕ, παίζουν οι νηματοειδείς μύκητες. Διακρίνονται τρεις τύποι μυκήτων που ζουν πάνω σε οργανική ύλη (ξύλο) που αποσυντίθεται, και αποικοδομούν ένα ή περισσότερα συστατικά του : οι μύκητες ελαφράς σήψης (*soft-rot fungi*), οι μύκητες καστανόχρωμης σήψης (*brown-rot fungi*) και οι μύκητες λευκής σήψης (*white-rot fungi*) [Gadd., 2001]. Οι τελευταίοι έχουν μελετηθεί αρκετά ως προς την βιοαποικοδομητική τους ικανότητα.

2.1.1 Μύκητες λευκής σήψης

Οι μύκητες λευκής σήψης είναι νηματοειδείς μύκητες και ανήκουν στην κατηγορία των Βασιδιομυκήτων. Αυτοί οι μύκητες χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να αποικοδομούν τη λιγνίνη, ένα από τα σπουδαιότερα και πιο άφθονα υλικά της φυτικής βιομάζας [Τόπακας, 2013]. Ονομάζονται μύκητες λευκής σήψης λόγω του λευκού και ινώδους υπολείμματος που απομένει πάνω στην οργανική ύλη αφού αποσυντεθεί.



Εικόνα 2.1: Μύκητας λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus*

Η ικανότητά τους να αποικοδομούν τη λιγνίνη είναι μοναδική και το λιγνινολυτικό σύστημα τους μπορεί να εφαρμοστεί σε μια μεγάλη ποικιλία τοξικών ενώσεων, όπως είναι οι φαινόλες στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. Η αποικοδόμηση της λιγνίνης ξεκινά στο τέλος της πρωτογενούς ανάπτυξης κατά το δευτερογενή μεταβολισμό με την απουσία θρεπτικών συστατικών όπως άζωτο, θείο και άνθρακας. Είναι μια οξειδωτική διαδικασία κατά την οποία διασπώνται οι αρωματικοί δακτύλιοι της λιγνίνης και δημιουργούνται νέες καρβονυλικές ομάδες ελατώνοντας έτσι το ποσοστό των φαινολικών και αλειφατικών ομάδων της. Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι ο αποπολυμερισμός της και η έκλυση διοξειδίου του άνθρακα [Hatakka, 2001; Kirk and Farrell, 1987].

Οι μύκητες αυτοί αποικοδομούν τη λιγνίνη επιλεκτικά ή μη επιλεκτικά. Στην επιλεκτική αποσύνθεση η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη αποικοδομούνται σε μεγαλύτερο βαθμό από την κυτταρίνη, ενώ στη μη-επιλεκτική αποσύνθεση αποικοδομούνται εξίσου η λιγνίνη, η ημικυτταρίνη και η κυτταρίνη [Blanchette, 1995; Hatakka 2001; Rayner & Boddy, 1988]. Για την επιλεκτική αποσύνθεση, χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι *Ceriporiopsis subvermispora*, *Dichomitus squalens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, ενώ για τη μη επιλεκτική οι *Trametes versicolor* και *Fomes fomentarius*. Ορισμένοι μύκητες όπως οι *Ganoderma applanatum*, *Heterobasidion annosum* και *Phellinus pini*, μπορούν να πραγματοποιήσουν και τους δύο τύπους αποσύνθεσης [Blanchette, 1995; Rayner & Boddy, 1988]. Το είδος της προσβολής ελέγχεται από τους θρεπτικούς παράγοντες που είναι παρόντες [Eaton & Hale, 1993; Rayner & Boddy, 1988].

Οι μύκητες λευκής σήψης κατά την αποικοδόμηση της λιγνίνης, παράγουν κάποιους τύπους ενζύμων όπως λακκάση (Lac), υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP), υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP) αλλά και υπεροξειδάσες ανεξάρτητες του μαγγανίου. Τα ένζυμα αυτά επιτρέπουν στους μύκητες να χρησιμοποιήσουν τα οργανικά υποστρώματα ως μια πηγή ενέργειας αλλά και θρεπτικών ουσιών [Osono.,

2007]. Τα λιγνινολυτικά αυτά ένζυμα θα αναλυθούν εκτενέστερα στο επόμενο κεφάλαιο.

2.1.2 Μύκητες καστανόχρωμης σήψης

Οι μύκητες καστανόχρωμης σήψης αποσυνθέτουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη απευθείας, παρακάμπτοντας τη λιγνίνη, αφήνοντας έτσι στο ξύλο ένα υπόστρωμα πλούσιο σε λιγνίνη. Ο μηχανισμός αποσύνθεσης περιλαμβάνει μη ενζυμικές αντιδράσεις και απουσία εξωγλουκανασών [Blanchette, 1995; Eriksson et al., 1990]. Από μελέτες έχει βρεθεί ότι ο μύκητας *Polyporus ostreiformis* παράγει MnP και LiP, σε ανάλογη ποσότητα με αυτή 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].



Εικόνα 2.2: Μύκητας καστανόχρωμης σήψης *Polyporus ostreiformis*

Οι μύκητες καστανόχρωμης σήψης αναπτύσσονται κυρίως σε δέντρα με μαλακό ξύλο παρά σε εκείνα με σκληρό ξύλο, ενώ η ανάπτυξή τους ευνοείται κυρίως σε κωνοφόρα δέντρα [Blanchette, 1995; Rayner & Boddy, 1988]. Έχουν μελετηθεί κυρίως μύκητες αυτής της κατηγορίας που αποσυνθέτουν κτίρια και ξύλινες κατασκευές όπως είναι οι *Serpula lacrymans* και *Gloeophyllum trabeum* [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 περιβάλλον, όπου η ανάπτυξη είναι δύσκολη για μύκητες που ανήκουν στην κατηγορία των Βασιδιομυκήτων, όπως σε υπερβολικά υγρό ή ξηρό κλίμα, καθώς και σε υποστρώματα πλούσια σε ιόντα μετάλλων ή συντηρητικά ξύλου. Οι μύκητες αυτής της κατηγορίας είναι ανθεκτικοί 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 κυρίως στο χύμα, στα πριονίδια, στο άχυρο και στο προϊόν κομποστοποίησης, ενώ κάποια είδη έχουν βρεθεί σε θαλάσσια και γλυκά ύδατα. Σε αντίθεση με τους μύκητες λευκής και καστανόχρωμης σήψης, ο ρυθμός προσβολής των μυκήτων ελαφράς σήψης αυξάνεται με την προσθήκη αζώτου. Επίσης, οι μικρομύκητες (micromycetes) αποδομούν τη λιγνίνη σε μεγαλύτερο βαθμό από τους άλλους λιγνινολυτικούς μύκητες σε καλλιεργήσιμα εδάφη και σε προϊόν κομποστοποίησης. Τέτοιοι μύκητες 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 δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για την ικανότητα αποδόμησης της λιγνίνης από τους μικρομύκητες. Αποσυνθέτουν όλα τα συστατικά του ξύλου, αλλά η απομάκρυνση της λιγνίνης είναι αργή και μερική, και γίνεται με απομεθυλίωση [Eaton & Hale, 1993; Rayner & Boddy, 1988]. Λίγες αναφορές υπάρχουν για τον ενζυμικό μηχανισμό των μυκήτων ελαφράς σήψης.



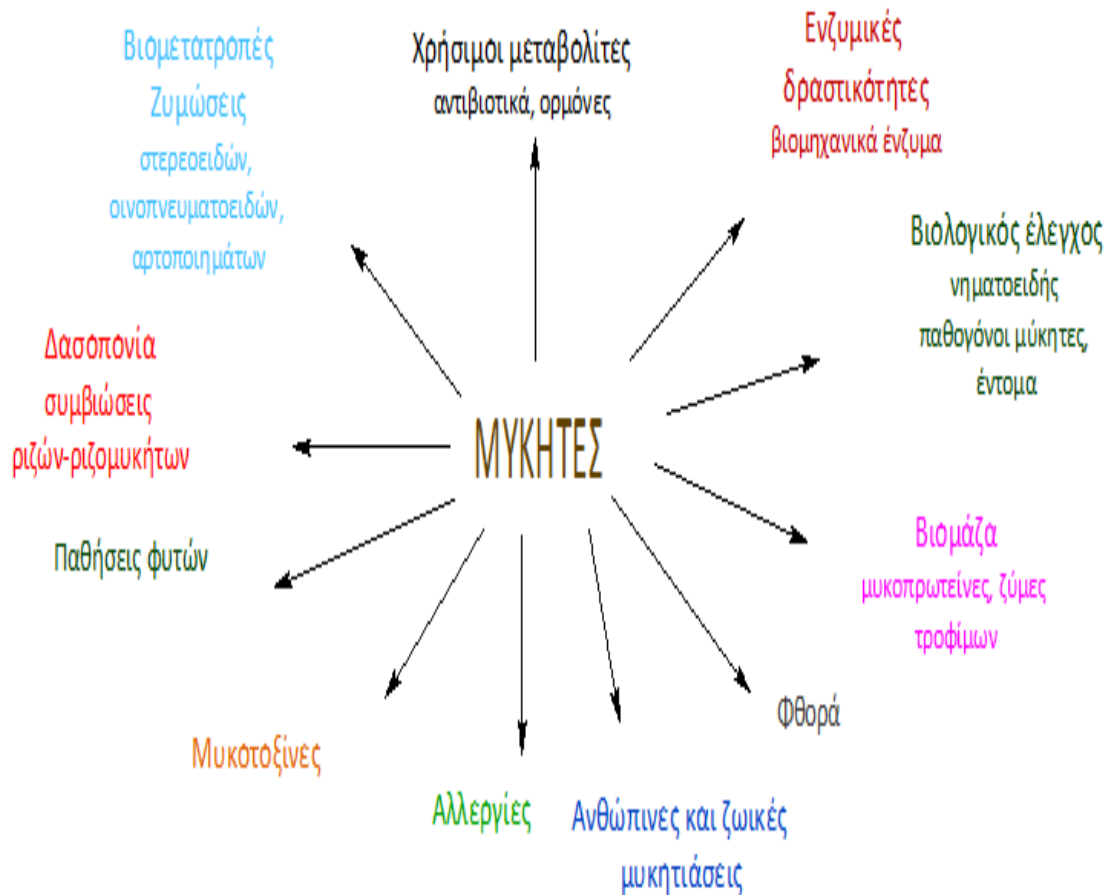
Εικόνα 2.3: Μύκητας ελαφράς σήψης του είδους *Marasmius*

2.2 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση των μυκήτων

Οι μύκητες έχουν σημαντικό οικολογικό ρόλο. Βοηθούν στη διατήρηση του κύκλου ζωής του άνθρακα και των ανόργανων αλάτων αλλά, όπως αναφέρθηκε, και στη διάσπαση της λιγνινοκυτταρίνης. Οι μύκητες έχουν την ικανότητα να τρέφονται με νεκρά φυτικά και ζωικά υπολείμματα. Με την αποσύνθεση αυτή, οι πολύπλοκες οργανικές ενώσεις διασπώνται σε απλούστερες ουσίες, απορροφούνται από τους μύκητες και εισέρχονται πάλι στον κύκλο της έμβιας ύλης.

Ακόμα, οι μύκητες παρουσιάζουν έντονο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Οι διάφορες ζυμώσεις για την παρασκευή κρασιού, ψωμιού, τυροκομικών προϊόντων και άλλων τροφών, η καλλιέργεια μανιταριών αποτελούν τις παραδοσιακές εφαρμογές της βιοτεχνολογίας των μυκήτων. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί νέες εφαρμογές που περιλαμβάνουν την παραγωγή αντιβιοτικών και φαρμακευτικών ουσιών, όπως πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, ενζύμων, όπως αμυλάση, κυτταρινάση, λακκάση, λιπάση, οξειδάση της γλυκόζης, πρωτεϊνάσες, πηκτινάση, ιμβερτάση, και οργανικών οξέων, όπως κιτρικό και ιτακονικό οξύ. Η παραγωγή αντιβιοτικών και ενζύμων για την υφαντουργία και την βιομηχανία τροφίμων είναι από τις πιο επικερδείς και αναπτυσσόμενες πλευρές της χρήσης των μυκήτων στη βιοτεχνολογία.

Παρόλα τα θετικά, υπάρχουν και ορισμένες αρνητικές επιπτώσεις από την χρήση των μυκήτων που αφορούν τον άνθρωπο, όπως αλλεργίες και μυκητιάσεις. Επίσης, προκαλούν πληθώρα ασθενειών σε καλλιεργούμενα φυτά και δέντρα με αποτέλεσμα την απώλεια μεγάλου μέρους ετήσιας γεωργικής παραγωγής. Η υπερβολική χρήση μυκητοκτόνων συμβάλλει στη μόλυνση υδάτινων και χερσαίων οικοσυστημάτων [Δρίτσα, 2006].

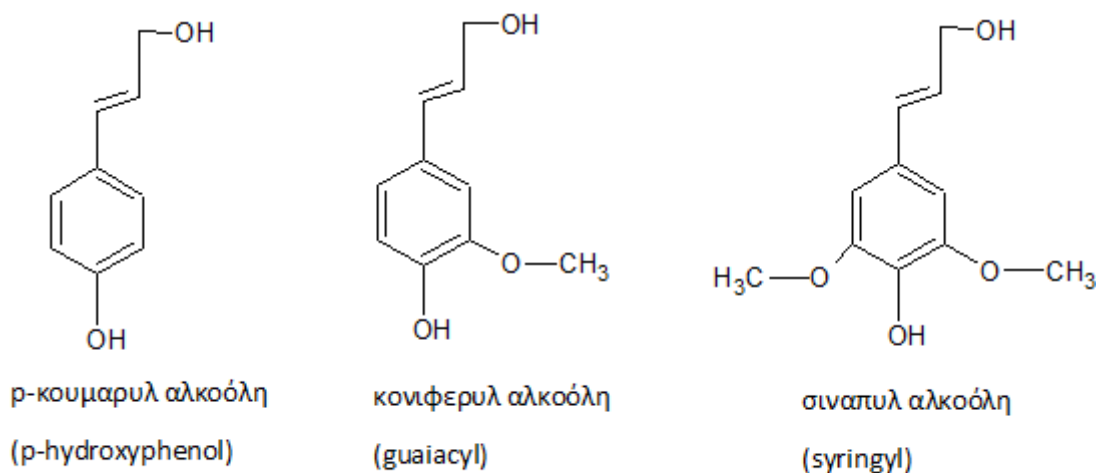


Εικόνα 2.4: Ωφέλιμες και επιβλαβείς δραστηριότητες των μυκήτων σε σχέση με τους ανθρώπους [Alexopoulos et al., 1996]

2.3 Λιγνίνη

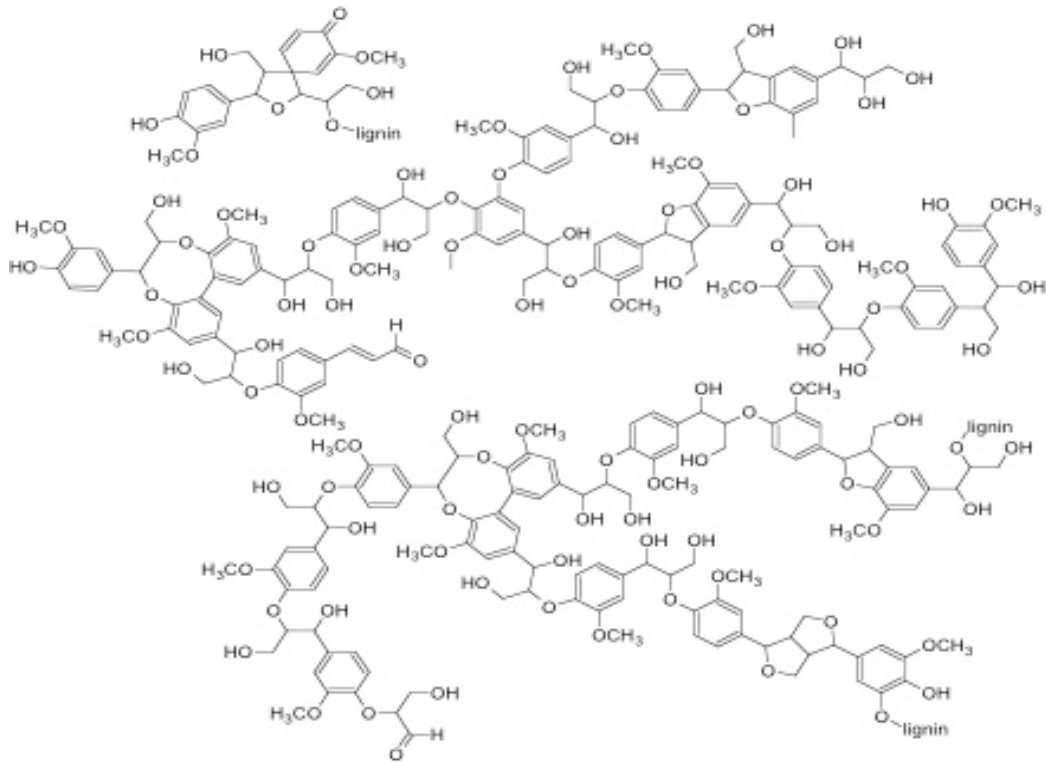
Τα κύρια συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη, που συνολικά αναφέρονται ως λιγνινοκυτταρίνη. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από δύο τμήματα, το πρωτογενές και το δευτερογενές. Το πρωτογενές τοίχωμα αποτελείται από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη ενώ το δευτερογενές από λιγνίνη. Γενικότερα, η κυτταρίνη προσδίδει υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό ενώ η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη προσδίδουν αντοχή, ακαμψία και συνεκτικότητα στα κύτταρα. Στο σύνολο της βιομάζας η κυτταρίνη αποτελεί το 38-50%, η ημικυτταρίνη το 23-32% ενώ η λιγνίνη το 15-25% [Τόπακας, 2013].

Η λιγνίνη είναι από τα πιο άφθονα και σπουδαιότερα οργανικά συστατικά της φυτικής βιομάζας. Το ποσοστό της ποικίλλει, π.χ σε ξύλο κωνοφόρων υπάρχει περίπου 20-30% περισσότερη λιγνίνη από ότι σε ξύλο πλατύφυλλων δέντρων. Η λιγνίνη είναι ένα τρισδιάστατο πολυμερές με υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100.000-300.000) και είναι άμορφη. Η βασική δομική μονάδα της είναι το φαινυλοπροπάνιο. Τρία είδη φαινυλοπροπανίου υπάρχουν στη λιγνίνη (Εικόνα 2-4) και αυτό κάνει τη διαφορά μεταξύ κωνοφόρων και πλατύφυλλων δέντρων [Τόπακας., 2013].



Εικόνα 2.5: Οι μονάδες φαινυλοπροπανίου της λιγνίνης [Gadd, 2001]

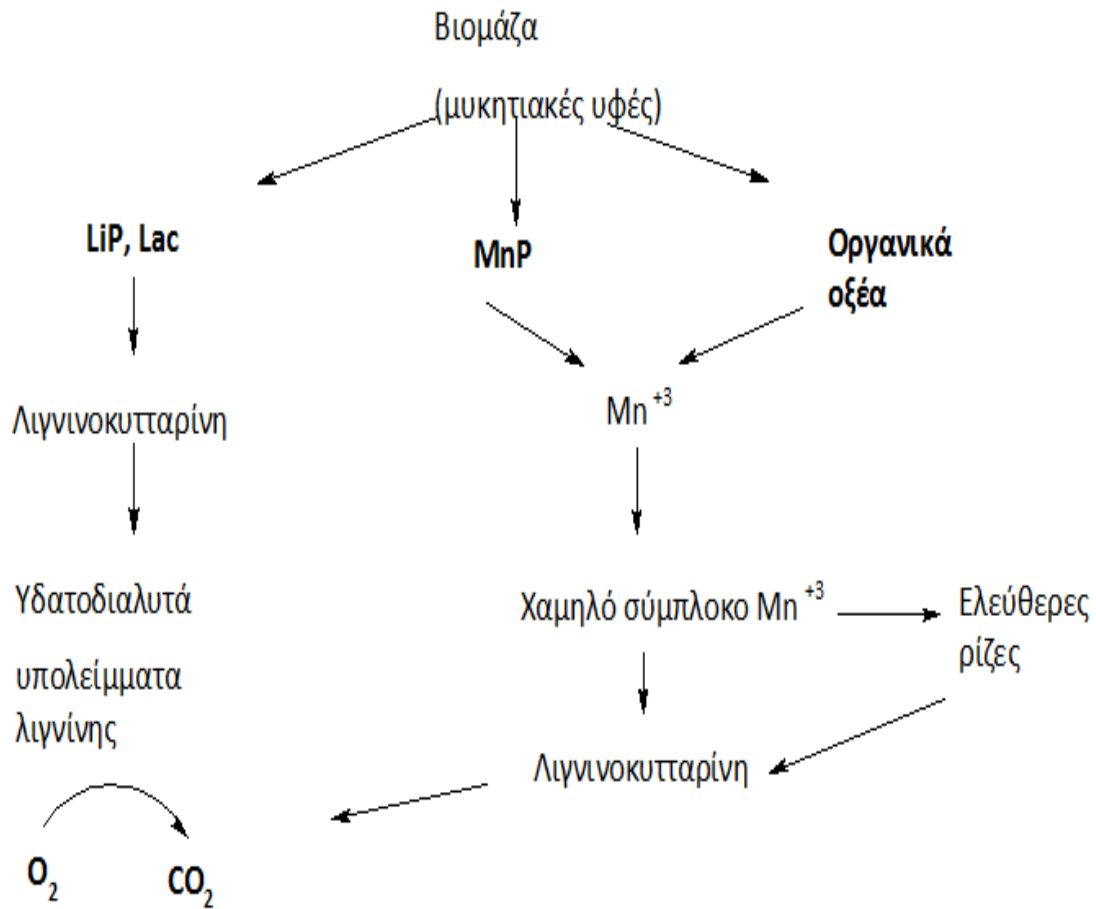
Η λιγνίνη είναι έντονα υδρόφοβη ουσία, η διόγκωσή της είναι χαμηλή και υδρολύεται δύσκολα σε αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (150-180 °C). Τέλος, οι δεσμοί της είναι αιθερικοί δεσμοί αλλά και δεσμοί άνθρακα-άνθρακα ενώ ενώνεται με χημικούς δεσμούς και με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη [Τόπακας, 2013].



Εικόνα 2.6: Μοντέλο λιγνίνης

2.4 Λιγνινολυτικά ένζυμα

Οι μικροοργανισμοί που είναι κυρίως υπεύθυνοι για την αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης είναι οι μύκητες και οι πιο ισχυροί αποικοδομητές αυτής της κατηγορίας είναι οι Βασιδιομύκητες. Πιο συγκεκριμένα, οι μύκητες λευκής σήψης αποικοδομούν το ξύλο με ταυτόχρονη προσβολή λιγνίνης και κυτταρίνης-ημικυτταρίνης ή επιλεκτικά αποικοδομούν πιο πολύ τη λιγνίνη από τους πολυσακχαρίτες [Eriksson et al., 1990; Kuhad et al., 1997]. Οι μύκητες λευκής σήψης κατά τη αποικοδόμηση του υποστρώματος εκκρίνουν ένζυμα, τα οποία συνολικά αναφέρονται ως «λιγνινάσες». Ύστερα από μελέτες με βάση το μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* αναγνωρίστηκαν δύο εξωκυτταρικές υπεροξειδάσες, η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και του μαγγανίου (MnP), τα οποία και είναι τα πιο σημαντικά λιγνινολυτικά ένζυμα. Επίσης, μια φαινολική οξειδάση, η λακκάση (Lac), είχε ήδη ανακαλυφθεί και δραστηριότητά της σχετίζεται με της αποικοδόμηση της λιγνίνης [Leonowicz et al., 1999].



Εικόνα 2.7: Αποικοδόμηση της λιγνίνης από τη συνεργιστική δράση της υπεροξειδάσης του μαγγανίου (MnP), της υπεροξειδάσης της λιγνίνης (LiP) και της λακκάσης (Lac) [Hofrichter., 2002]

Σπανίως συναντώνται και τα τρία αυτά ένζυμα σε έναν μικροοργανισμό, διότι διαφορετικοί λιγνινολυτικοί μύκητες παράγουν διαφορετικούς συνδυασμούς των παραπάνω ενζύμων όπως, Lac-MnP, Lac-LiP ή MnP- LiP [Hattaka, 1994]. Η αποικοδόμηση της λιγνίνης δεν είναι μια εξειδικευμένη διαδικασία και βασίζεται στην παραγωγή ριζών από τα ένζυμα οι οποίες προσβάλλουν τους αρωματικούς δεσμούς της λιγνίνης. Η αποικοδόμηση μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό υδατοδιαλυτών προϊόντων και την ανοργανοποίηση, όπως είναι η πλήρης μετατροπή του οργανικού άνθρακα σε διοξείδιο του άνθρακα [Dorado et al., 1999].

Συγκεντρωτικά, τα εξωκυτταρικά λιγνινολυτικά ένζυμα που παίζουν ρόλο στην αποικοδόμηση της λιγνίνης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Εξωκυτταρικά λιβνινολυτικά ένζυμα που συμμετέχουν στην αποδόμηση της λιγνίνης [Δρίτσα, 2006]

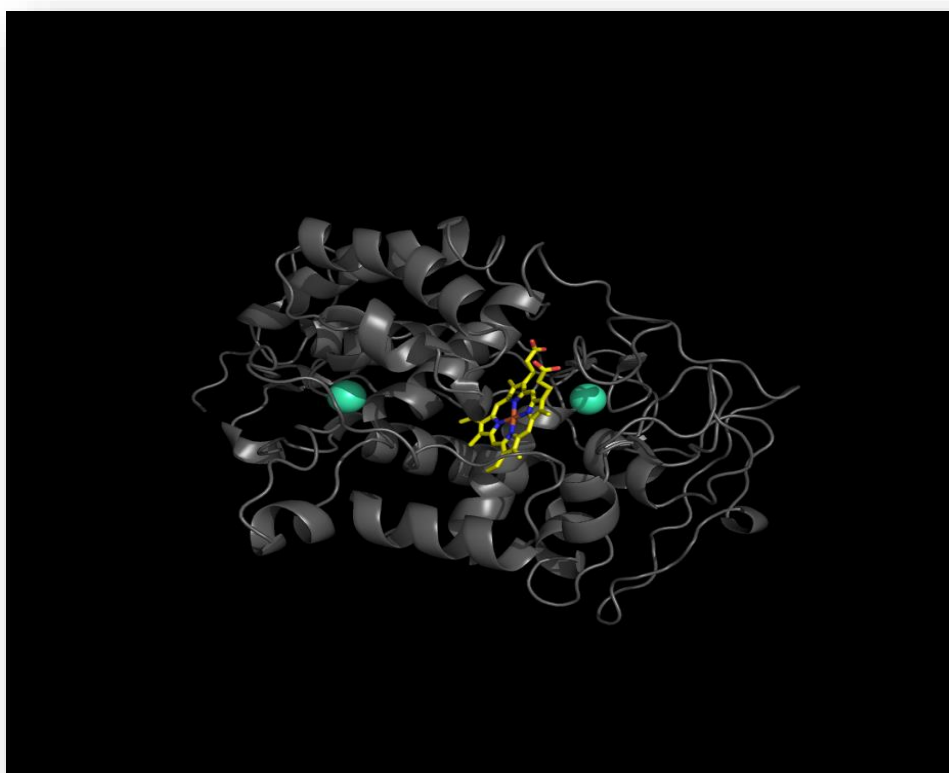
Ένζυμο	Συνένζυμο	Υπόστρωμα	Επίδραση ή αντίδραση
Υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP)	H ₂ O ₂	Βερατρυλική αλκοόλη	Αρωματικός δακτύλιος οξειδώνεται στην αντίστοιχη κατιοντική ρίζα
Υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP)	H ₂ O ₂	Mn ⁺² , οργανικά οξέα, θειόλες, ακόρεστα λιπίδια	Mn ⁺² οξειδώνεται σε Mn ⁺³ , οξείδωση 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 Υδροξυ-βενζοτριαζόλη (hydroxyl-benzotriazole, ABTS)	Φαινόλες οξειδώνεται σε φαινοξυλικές ρίζες
Οξειδάση της γλυοξάλης (Glyoxal oxidase, GLOX)		Γλυοξάλη (Glyoxal) Μεθυλική γλυοξάλη (methyl glyoxal)	Γλυοξάλη (Glyoxal) οξειδώνεται σε γλυοξυλικό οξύ (Glyoxylic acid), παραγωγή H ₂ O ₂
Οξειδάση της αρυλικής αλκοόλης (Aryl alcohol oxidase, AAO)		Αρωματικές αλκοόλες (ανισυλική, βερατρυλική αλκοόλη)	O ₂ ανάγεται σε H ₂ O ₂
Cellobiose: quinine 1-oxidoreductase (CBQ)		Κελλοβιόζη (Cellobiose)	Αναγωγή των ο- και p- κινόνων

2.4.1. 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 αυτό διαθέτει μια πρωτοπορφυρίνη IX (C₃₄H₃₂FeN₄O₄) ανά μόριο και έχει βέλτιστο pH δράσης περίπου 3.0 [Kirk & Farrell, 1987]. Αρχικά, η LiP απομονώθηκε από το 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]. Στην Εικόνα

2.8 παρουσιάζεται η δομή του ενζύμου από το μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* εκφρασμένο σε *E.coli* (Protein Data Bank, ID: 1B82) [Blodig et al., 2001].

Η αποικοδόμηση της λιγνίνης από την LiP βασίζεται στις εξής καταλυόμενες αντιδράσεις: διάσπαση του δεσμού C α -C β σε β -O-4 αρυλ-αιθερικές ενώσεις, οξείδωση του C α των παραπάνω ενώσεων στις αντίστοιχες κετόνες, οξειδωτική σχάση του αρωματικού δακτυλίου μεταξύ C $_3$ -C $_4$, απομεθυλίωση και υδροξυλίωση των βενζυλικών μεθυλενομάδων. 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].



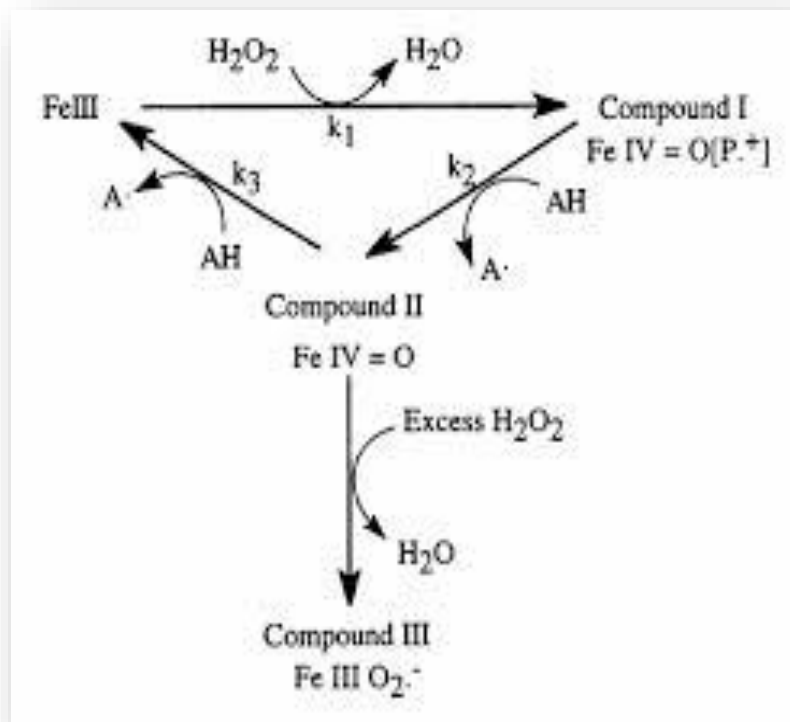
Εικόνα 2.8: Δομή υπεροξειδάσης της λιγνίνης από το μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* (με γαλάζιο χρώμα παρουσιάζονται τα ιόντα Ca⁺² και με κίτρινο το ενεργό κέντρο του ενζύμου) [Blodig et al., 2001]

Ο καταλυτικός κύκλος της LiP αρχίζει με τη δέσμευση του H $_2$ O $_2$ στην ομάδα αίμης, το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αρχικά, το ένζυμο στη μορφή τρισθενούς σιδήρου – LiP, υποβάλλεται σε μια οξείδωση δύο ηλεκτρονίων και παράγεται η Ένωση I

(compound I), μια οξειδοαναγωγική ένωση που περιέχει το Fe^{4+} και επακολουθεί η αναγωγή του H_2O_2 σε H_2O (Εικόνα 2.9). Η ένωση I πραγματοποιεί μια οξείδωση ενός ηλεκτρονίου κάποιου υποστρώματος (ένα μονομερές της λιγνίνης ή βερατρυλική αλκοόλη) παράγοντας την Ένωση II (compound 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 ενζυμικών αντιδράσεων, δημιουργώντας μια ποικιλία προϊόντων [Kirk & Farrell, 1987]. Η Ένωση III (compound 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]. Σε κάποιες περιπτώσεις αποδίδεται διαφορετικός ρόλος για τη βερατρυλική αλκοόλη, αυτός 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. Ακόμα, 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 διείδυση ενός ενζύμου [Jurasek, 1995].

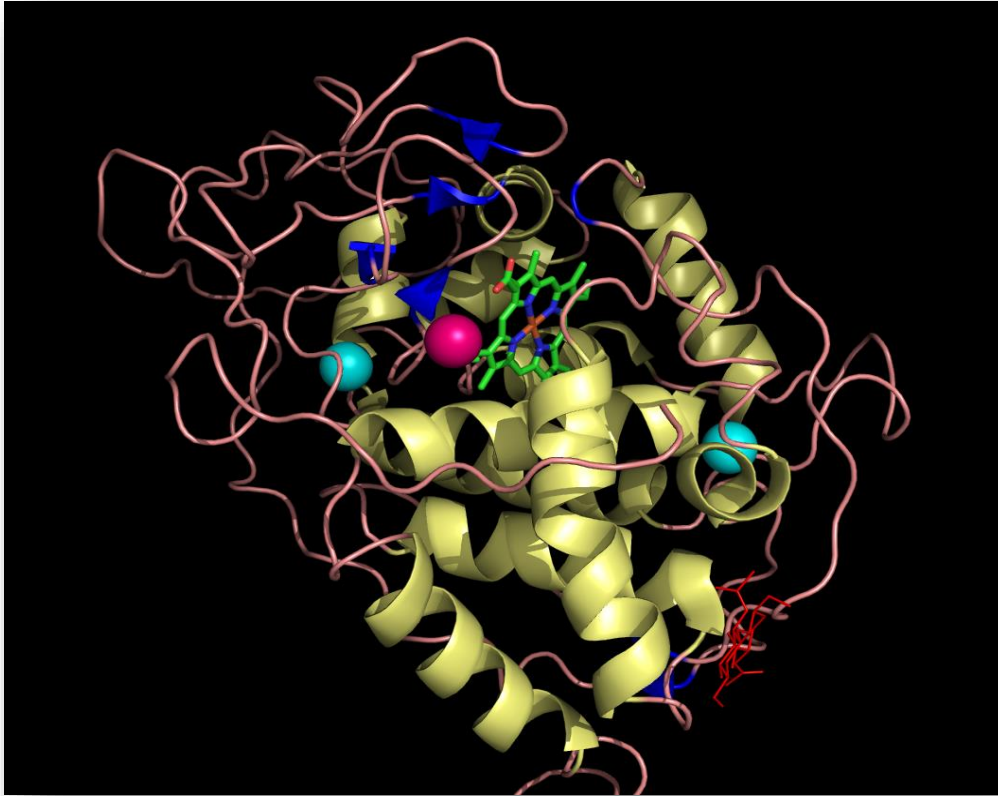
Η LiP εκφράζεται από τους μύκητες λευκής σήψης ως μια σειρά ισοενζύμων. Οι Odier και Delattre (1990) απομόνωσαν 9 διαφορετικά ισοένζυμα της LiP από τον μύκητα *P. chrysosporium*. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν μικρές διαφορές στις κινητικές παραμέτρους, αλλά η μεταξύ τους ομοιότητα είναι μεγάλη, όπως αποδεικνύεται 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, K_m (σταθερά Michaelis- Menten) για διάφορα υποστρώματα [Barclay, 1990; Kirk et al., 1986].



Εικόνα 2.9: Ο καταλυτικός κύκλος της υπεροξειδάσης της λιγνίνης (AH+:ρίζα του υποστρώματος) [Gold et al., 1989]

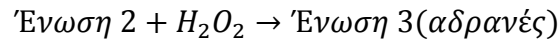
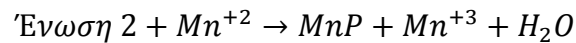
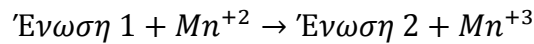
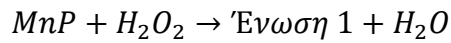
2.4.2. Υπεροξειδάση του Μαγγανίου

Η υπεροξειδάση του μαγγανίου, MnP, (EC 1.11.1.13) παράγεται κυρίως από τους βασιδιομύκητες και ανακαλύφθηκε αμέσως μετά την LiP από τους Kuwahara et al. (1984) και περιγράφηκε από τους Glenn και Gold (1985). Οι ίδιοι ανέφεραν ότι το μοριακό βάρος της MnP είναι περίπου 4600. Η MnP είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει ομάδα αίμης και χρησιμοποιεί υπεροξείδιο του υδρογόνου 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 το οξαλικό ή το 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. Στην Εικόνα 2.10 παρουσιάζεται η δομή του ενζύμου από το μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* (Protein Data Bank, ID: 1MNP) [Sundaramoorthy et al., 1994].



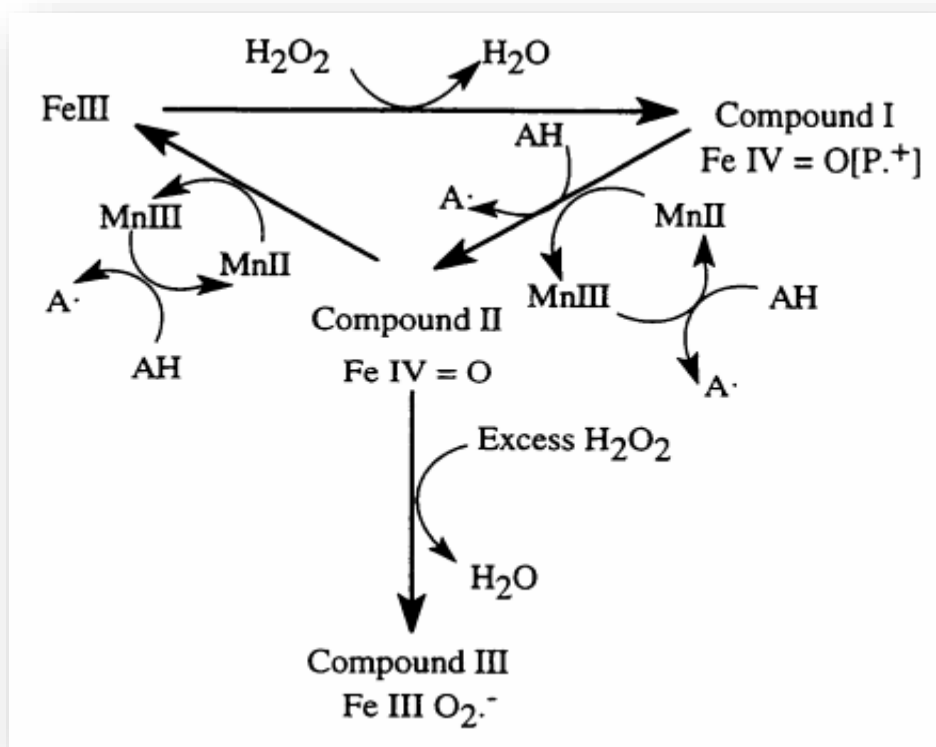
Εικόνα 2.10: Δομή υπεροξειδάσης του μαγγανίου από το μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* (με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου, με φούξια Mn^{2+} , με γαλάζιο τα ιόντα Ca^{2+} και με κόκκινο η «γέφυρα» *N*-ακετυλο-*D*-γλυκοζαμίνη) [Sundaramoorthy et al., 1994]

Ο καταλυτικός κύκλος της MnP αρχίζει με τη δέσμευση του H_2O_2 στην ομάδα αίμης, το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 2.12). Το H_2O_2 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 Ένωση I (compound I) που περιέχει την οξειδωμένη αίμη με την κατιοντική ρίζα της πορφυρίνης. Ακολουθεί η αναγωγή της Ένωσης I στη μορφή II με παράλληλη οξείδωση ιόντος Mn^{2+} σε Mn^{3+} . Η σχηματιζόμενη Ένωση II (compound II) είναι επίσης ικανή να οξειδώσει ένα ιόν Mn^{2+} . Το στάδιο αυτό κλείνει τον κύκλο και η είσοδος ενός H_2O_2 καταλήγει στην παραγωγή δύο H_2O και δύο χηλικών ιόντων Mn^{3+} [Wariishi et al., 1992]. Το Mn^{3+} ή το χηλικό σύμπλοκο του Mn^{3+} μπορεί με τη σειρά του να οξειδώσει μονομερείς ή διμερείς φαινόλες, καρβοξυλικά οξέα, θειόλες και ακόρεστα λιπαρά οξέα σχηματίζοντας τις αντίστοιχες ρίζες [Hofrichter, 2002].



Εικόνα 2.11: Καταλυόμενες αντιδράσεις την υπεροξειδάση του μαγγανίου

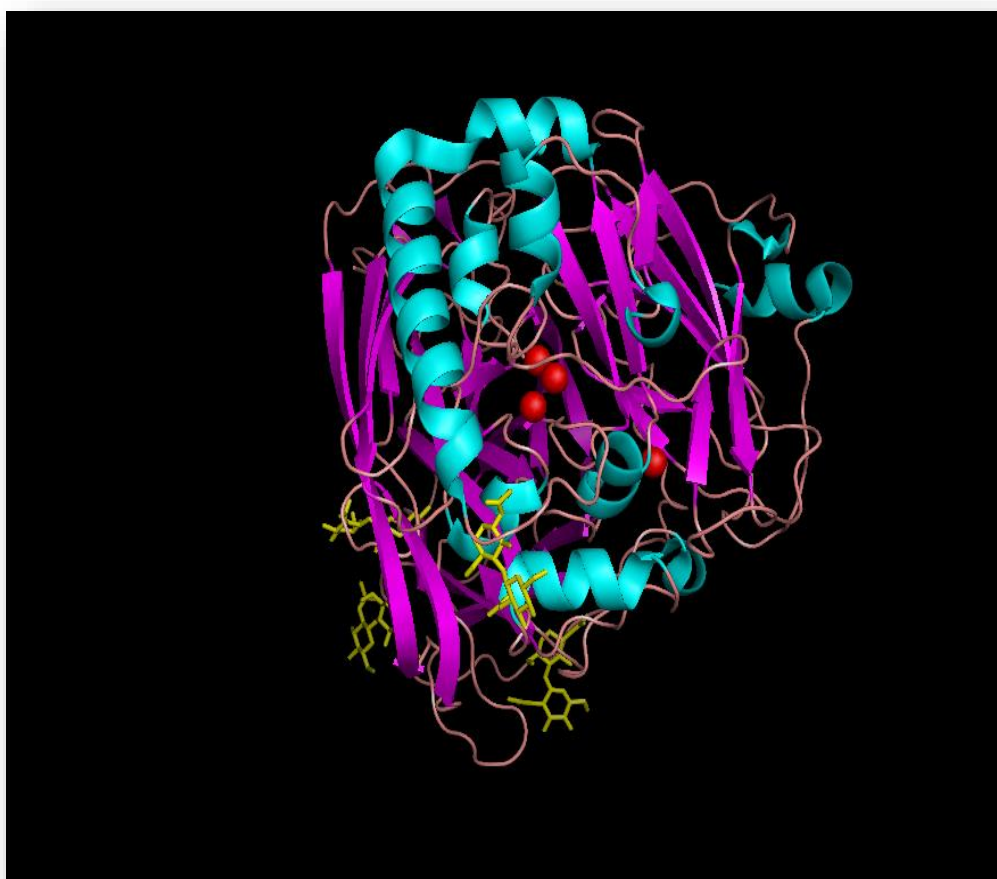
Ο καταλυτικός κύκλος της MnP διαφέρει από τον κύκλο της LiP στο γεγονός ότι η Ένωση II ανάγεται άμεσα από το Mn^{2+} στην αρχική της μορφή [Wariishi et al., 1989]. Οι φαινοξυλικές ρίζες σχηματίζονται επομένως από τη διάσπαση των δεσμών Ca-Cβ ή αλκυλ-φαίνυλο, προκαλώντας τον αποπολυμερισμό σε μικρότερα 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. Τέλος, το ένζυμο αυτό αδυνατεί να ολοκληρώσει τον καταλυτικό κύκλο χωρίς την παρουσία του Mn [Wariishi et al. 1988]



Εικόνα 2.12: Ο καταλυτικός κύκλος της υπεροξειδάσης του μαγγανίου [Gold et al. 1989]

2.4.3. Λακκάση

Η λακκάση (Lac, EC 1.10.3.2) είναι μία πολυφαινολική οξειδάση και συγκεκριμένα είναι μέλος μιας ομάδας ενζύμων γνωστών ως κυανών 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. Τα ένζυμα αυτά είναι μονομερείς πρωτεΐνες με τέσσερα άτομα χαλκού και έχουν μοριακά βάρη ανάμεσα σε 50 και 300 kDa και όξινα ισοηλεκτρικά σημεία [Mester & Tien, 2000]. Οι λακκάσες παράγονται τόσο από φυτά όσο και από μύκητες. Στην Εικόνα 2.13 παρουσιάζεται η δομή της λακκάσης από το μύκητα *Melanocarpus albomyces* εκφρασμένο σε *Hypocrea jecorina* (Protein Data Bank, ID: 3QPK) [Kallio et al., 2011].



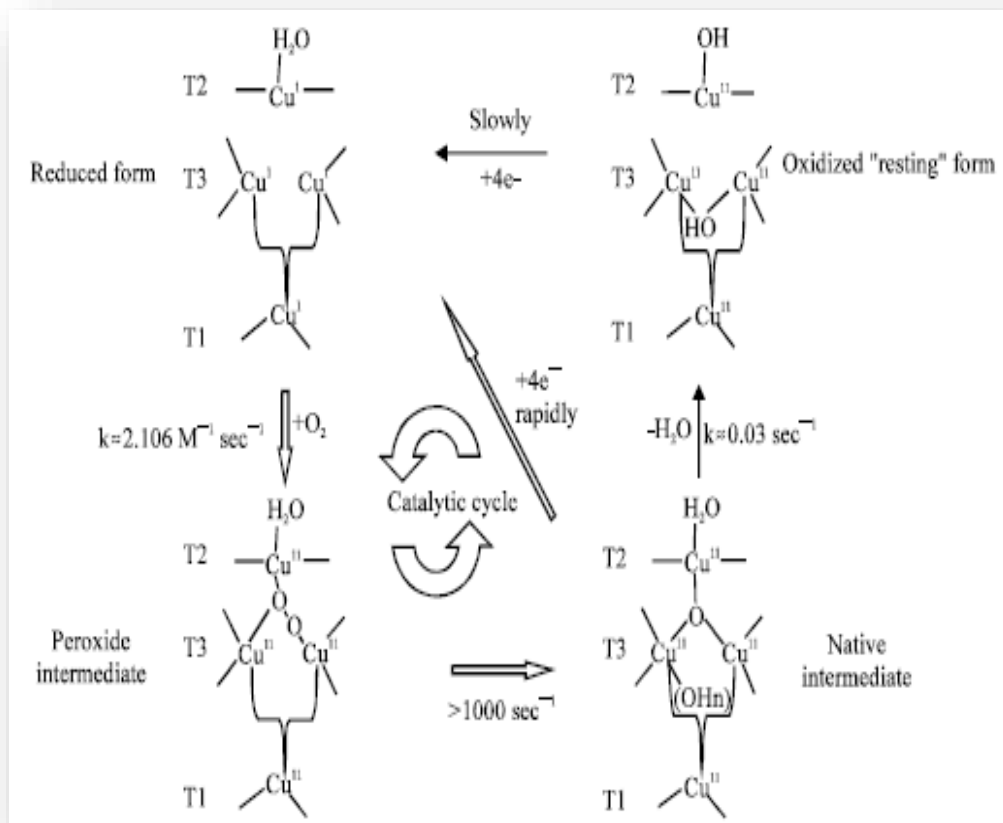
Εικόνα 2.13: Δομή λακκάσης από το μύκητα *Melanocarpus albomyces* (με κόκκινο χρώμα τα ιόντα Cu^{+2} και κίτρινα οι «γέφυρες» *N*-ακετυλο-*D*-γλυκοζαμίνη) [Kallio et al., 2011]

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, για μήκος κύματος περίπου 600 nm. Αυτό το χαρακτηριστικό

προσδίδει ένα ευδιάκριτο μπλε χρώμα στα ένζυμα που περιέχουν κέντρα χαλκού “τύπου 1”. Η λειτουργία αυτών των κέντρων Cu βασίζεται κυρίως στη μεταφορά ηλεκτρονίων και όχι στην κατάλυση. Αυτό είναι που τα ξεχωρίζει από τα μονοπυρηνικά κέντρα Cu “τύπου 2”. Τα κέντρα Cu “τύπου 3” αποτελούνται από δύο στενά οριοθετημένα άτομα Cu και χρησιμεύουν στην κατάλυση, ειδικότερα στη δέσμευση και ενεργοποίηση του οξυγόνου. 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 υποστρώμα στην καταλυτική τριάδα (και ακολούθως στο οξυγόνο) μέσω του κέντρου “τύπου 1”.

Η λακκάση καταλύει την οξειδωση ενός ηλεκτρονίου του 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 H₂O από 1 O₂ (Εικόνα 2.12). Η απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου καταλύεται από τη λακκάση και οδηγεί στο σχηματισμό μιας ελεύθερης οργανικής ρίζας. Αυτός ο τύπος είναι γενικά ασταθής και υπόκειται σε περαιτέρω αντιδράσεις, είτε αυθόρμητες (για παράδειγμα πολυμερισμός ή διάσπαση) ή ενζυμικά καταλυόμενες (αναγωγή ή οξειδωση 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. Παραδείγματος χάριν, πολλά μη φαινολικά υποστρώματα 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 υπέδειξε ότι το ένζυμο παίζει ρόλο στα μυκητιακά συστήματα παρουσία ενός φυσιολογικού ισοδύναμου του ABTS.



Εικόνα 2.14: Ο καταλυτικός κύκλος της λακκάσης [Osma, 2009]

Τόσο η λακκάση όσο και οι δύο λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες εκφράζονται ως πολλαπλά ισoenζυμα. Τα πολλαπλά ισoenζυμα λακκάσης αρχικά, 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* και τα πέντε γονίδια λακκάσης του *Trametes villosa*. Τα παραδείγματα αυτά αποδεικνύουν, ότι μέρος της βιοχημικής ποικιλίας των ισoenζύμων της λακκάσης, μπορεί να οφείλεται στη γονιδιακή πολλαπλότητα των αντίστοιχων γονιδίων του ενζύμου [Mansur et al., 1998].

2.5 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές λιγνινολυτικών ενζύμων

Τα λιγνινολυτικά ένζυμα έχουν ποικίλες εφαρμογές τόσο στο κλάδο της βιομηχανίας όσο και τις βιοτεχνολογίας, λόγω της ικανότητας τους να συμμετέχουν σε πολλές διεργασίες. Τα λιγνινολυτικά ένζυμα παρουσιάζουν δυνατότητες εφαρμογής σε πάρα πολλούς τομείς, μεταξύ των οποίων τα τρόφιμα, τα καύσιμα, η γεωργία κ.ά. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένες εφαρμογές των ενζύμων αυτών.

❖ Οργανικές, ιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές

Η χρήση της λακκάσης ως νέο βιοκαταλύτη στην οργανική σύνθεση έχει μελετηθεί αρκετά τον τελευταίο καιρό. Η λακκάση έχει την ικανότητα να παράγει απευθείας πολυμερή που είναι αδύνατον να παραχθούν μέσω συμβατικών χημικών συνθέσεων και έτσι ο ενζυμικός πολυμερισμός με τη χρήση λακκάσης έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών είναι η οξειδωση λειτουργικών ομάδων, η σύζευξη των φαινολών και των στεροειδών, η χρήση τους ως ιατρικοί παράγοντες (αντιβιοτικά, αναισθητικά, αντιφλεγμονώδη και ηρεμιστικά), η δημιουργία δεσμών άνθρακα -αζώτου, στη σύνθεση περίπλοκων φυσικών προϊόντων και η χρήση τους στη βιομηχανία καλλυντικών [Maciel et al., 2010].

❖ 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 μπίρα, κρασί και χυμό φρούτων [Maciel et al., 2010].

❖ Βιοεξυγίανση

Η βιοεξυγίανση είναι μια τεχνική εξυγίανσης, που χρησιμοποιεί βιολογικές διεργασίες για την αποικοδόμηση των ρύπων. Η λακκάση συμμετέχει στην βιοεξυγίανση ρυπασμένων περιοχών διότι μπορεί να αποικοδομήσει τις ξενοβιοτικές ενώσεις, που αποτελούν μία μεγάλη πηγή μόλυνσης του εδάφους. Ακόμα, έχει τη δυνατότητα να αποικοδομεί τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – PAHs) ανήκουν στην κατηγορία των επίμονων τοξικών ενώσεων προκαλώντας πολύ σοβαρά προβλήματα στον άνθρωπο και στο περιβάλλον. Σημαντικότερη πηγή ρύπανσης από PAHs είναι η βιομηχανία πετρελαίου [Maciel et al., 2010]. Επίσης, ακινητοποιημένη λακκάση βρέθηκε ότι είναι χρήσιμη στην αποικοδόμηση φαινολικών και χλωριωμένων φαινολικών ρύπων [Ehlers et al., 2005]. Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για το μετασχηματισμό της 2,4,6-τριχλωροφαινόλης (2,4,6-trichlorophenol) σε 2,6-διχλωρο-1,4 υδροκινόλης (2,6-dichloro-1,4hydroquinol) και 2,6-διχλωρο-1,4-βενζοκινόνης (2,6-dichloro-1,4-benzoquinone) [Leontievsky et

al.,2000]. Οι λακκάσες από μύκητες λευκής σήψης χρησιμοποιούνται για την οξείδωση αλκενίων, καρβοζολίων, N-αιθυλοκαρβοζολίων, φθορενίων και διβενζοθειοφθενίων παρουσία ABTS και HBT ως μεσολαβητές (mediators) [Niku et al.,2000].

❖ Βιομηχανία υφασμάτων/χρωστικών

Η ανάπτυξη των διεργασιών που βασίζονται στη λακκάση αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη λύση στην επεξεργασία αποβλήτων λόγω της δυνατότητας αποδόμησης χρωστικών με ποικιλία χημικής δομής συμπεριλαμβανομένων των συνθετικών βαφών που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως στη βιομηχανία υφασμάτων. Η υπεροξειδάση της λιγνίνης έχει επίσης αξιολογηθεί στον αποχρωματισμό διάφορων συνθετικών βαφών. Τέλος, η υπεροξειδάση του μαγγανίου έχει βρεθεί ότι μπορεί να αποικοδομήσει χρωστικές ουσίες [Maciel et al., 2010].

❖ Βιομηχανία χάρτου

Στην παρασκευή χαρτιού, τα δύο βασικά βήματα 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 την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, 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, αφού 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 [Arora and Sharma, 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 περιοριστεί με διάφορες χημικές και φυσικές μεθόδους αποθείωσης, που όμως απαιτούν πολύ έντονες συνθήκες, όπως υψηλή θερμοκρασία και πίεση, και έχουν υψηλό κόστος. Εναλλακτικά, η αποθείωση των ορυκτών καυσίμων με τη χρήση ενζύμων, όπως η λακκάση, μπορεί να γίνει σε ηπιότερες συνθήκες και να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα [Arora and Sharma, 2010].

2.6 Αξιολόγηση των μυκήτων λευκής σήψης στην βιοαποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα ελαιουργείων

Οι μύκητες που ανήκουν στην ομάδα λευκής σήψης όπως οι *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Dichomitus squalens*, κ.α., έχουν κατά καιρούς αξιολογηθεί, ως προς την ικανότητά τους στη βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείων. Η σημαντική ικανότητα αποχρωματισμού που έδειξε ο μύκητας *Phanerochaete chrysosporium* [Sayadi and Ellouz, 1992], συσχετίστηκε με την ταχύτητα και την ικανότητά του να αποικοδομεί αρωματικές ενώσεις μεγάλου και μικρού μοριακού βάρους. Ο ιδιαίτερα υψηλός βαθμός αποχρωματισμού που παρατηρείται με τη δράση ορισμένων μυκήτων, συσχετίζεται με τη δράση των ενζύμων LiP και MnP.

Οι μύκητες του γένους *Pleurotus*, είναι από τους πιο αποδοτικούς, όσον αφορά στην παραγωγή κυτταρινολυτικών και λιγνινολυτικών ενζύμων. Σε έρευνες που έγιναν κατά την καλλιέργεια τεσσάρων ειδών του γένους *Pleurotus* σε υγρά απόβλητα ελαιουργείου διαπιστώθηκε ότι τα είδη αυτά που παρήγαγαν περισσότερη λακκάση, αποικοδομούσαν τις φαινολικές ενώσεις ταχύτερα και πληρέστερα [Sanjust et al., 1991]. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της βιομάζας προκαλεί ταυτόχρονη αύξηση παραγωγής ενζύμου [Kerem et al., 1992]. Έτσι αποδεικνύεται ότι η λειτουργία του ενζυμικού συστήματος βιοαποδόμησης των μυκήτων του γένους *Pleurotus*, ενεργοποιείται από μια σειρά ενώσεων που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα ελαιουργείων όπως οι πολυφαινόλες, οι αρωματικές αμίνες, οι διμέθυλο-τριμέθυλοφαινόλες κ.α., έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της τοξικότητας των αποβλήτων [Martirani et al., 1996].

Ωστόσο, είναι φανερό ότι οι μύκητες λευκής σήψης, ανάλογα με το είδος παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις όσον αφορά στην ικανότητα αποχρωματισμού και μείωσης φαινολικών ουσιών των αποβλήτων των ελαιουργείων.

Τα πλεονεκτήματα χρήσης των μυκήτων λευκής σήψης συνοψίζονται ως εξής [Μπλίκια, 2008]:

- ✓ Μπορούν να αναπτυχθούν σε υποστρώματα χαμηλού κόστους όπως υπολείμματα γεωργικών και δασικών εκμεταλλεύσεων (οι υπεροξειδάσες αναπτύσσονται λόγω τροφικής ανεπάρκειας και όχι λόγω καταστολής της σύνθεσης πρωτεϊνών, και έτσι για τους μύκητες λευκής σήψης δε χρειάζεται να μεσολαβήσει περίοδος προσαρμογής)
- ✓ Με την προϋπόθεση πως θα αναπτυχθούν οι κατάλληλοι μηχανισμοί εμβολιασμού και διασποράς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποικοδόμηση ρυπαντών σε υδάτινους και εδαφικούς αποδέκτες

- ✓ Τα παραγόμενα από τους μύκητες ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν απ' ευθείας, ιδιαίτερα μετά την ακινητοποίηση τους σε κατάλληλα συστήματα-φορείς

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν 2 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

Σύμφωνα με δεδομένα από τη Mycobank, στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η ταξινόμησή τους.

Πίνακας 3.1: Ταξινόμηση χρησιμοποιούμενων Βασιδιομυκήτων (Mycobank)

	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	<i>Irpex lacteus</i>
Βασίλειο	Fungi	Fungi
Φύλο	Basidiomycota	Basidiomycota
Κλάση	Agaricomycetes	Agaricomycetes
Τάξη	Agaricales	Polyporales
Οικογένεια	Pleurotaceae	Meruliaceae
Γένος	<i>Pleurotus</i>	<i>Irpex</i>
Είδος	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	<i>Irpex lacteus</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

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Κίνα)
- Επωαστήρας Orbital incubator S150, Stuart Scientific (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- 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 πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς)

3.1.4. Θρεπτικά υποστρώματα

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για τις υγρές καλλιέργειες των μικροοργανισμών αποτελούνταν από απόβλητο ελαιουργείου κατάλληλα επεξεργασμένο και αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 6 συγκέντρωσης 0,1 Μ. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος προστέθηκε άγαρ σε συγκέντρωση 15 g/l. Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 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 και στους δοκιμαστικούς σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν ως stock για τον εμβολιασμό των προκαλλιιεργειών. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας περιέχει περίπου 5 ml υποστρώματος.

Παρασκευή τρυβλίων με PDA

Το PDA (Potato-Dextrose-Agar) είναι ένα υπόστρωμα που αποτελείται από εκχύλισμα πατάτας, γλυκόζη και άγαρ και είναι ιδανικό για την ανάπτυξη μυκήτων. Ζυγίζονται 2,34 g PDA και διαλύονται υπό ανάδευση σε 60 ml H₂O και στη συνέχεια το μίγμα διαμοιράζεται σε 12 δοκιμαστικούς σωλήνες των 5 ml. Παράλληλα, προστίθενται 11,7 g PDA σε 300 ml H₂O και τοποθετούνται σε δοχείο pyrex. Οι παραπάνω υπολογισμοί γίνονται με βάση τη συγκέντρωση του PDA που είναι 39 g/l

σε H₂O. Έπειτα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες και το δοχείο pyrex αποστειρώνονται στους 121 °C για 20 min. Το αποστειρωμένο υπόστρωμα υπό στείρες συνθήκες τοποθετείται σε 13 τρυβλία petri. Ακολουθεί ο εμβολιασμός των δοκιμαστικών και των τρυβλίων με τα 2 στελέχη των βασιδιομυκήτων. Τα δείγματα αφήνονται για επώαση στους 25 °C.



Εικόνα 3.1: *Pleurotus citrinopileatus* αναπτυγμένο σε PDA

3.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη ρύθμιση του pH στις καλλιέργειες αλλά και για τις αναλυτικές μεθόδους φαίνονται στον πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Συγκεντρώσεις και pH χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων

pH	Συγκέντρωση (M)	Ρυθμιστικό διάλυμα
3	0,05	Τρυγικό οξύ-Τρυγικό νάτριο
4	0,1	K ₂ HPO ₄ -Κιτρικό οξύ
4,5	0,1	Ηλεκτρικό οξύ-Γαλακτικό νάτριο
5	0,1	K ₂ HPO ₄ -Κιτρικό οξύ
6	0,1	K ₂ HPO ₄ - KH ₂ PO ₄
7	0,05	K ₂ HPO ₄ -Κιτρικό οξύ
8	0,1	Tris-HCl
9	0,1	Tris-HCl

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

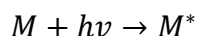
3.2.1. Μέτρηση ενεργότητας λακκάσης

Η λακκάση είναι μία πολυφαινολική οξειδάση που περιέχει χαλκό στο μόριο της και χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο για να οξειδώσει διάφορες αρωματικές και μη αρωματικές ενώσεις μέσω ενός μηχανισμού αντίδρασης με ρίζες. Είναι από τα κύρια ένζυμα που παράγουν οι βασιδιομύκητες και στη δράση τους οφείλεται η διάσπαση των φαινολικών ενώσεων. 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. Η φασματοφωτομετρία είναι από τις πιο σημαντικές αναλυτικές μεθόδους και χρησιμοποιείται κυρίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ουσιών. Η συγκέντρωση χημικών ουσιών συνδέεται με την απορρόφηση με την εξίσωση:

$$A = \varepsilon * b * C$$

Η παραπάνω εξίσωση ονομάζεται νόμος των Beer-Lambert. Η απορρόφηση, A , αναφέρεται στο φαινόμενο εκείνο κατά το οποίο μια χημική ουσία (μόριο, ιόν, άτομο) που βρίσκεται διαλυμένο σε διαφανές μέσο, απορροφά επιλεκτικά συχνότητες από το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα με βάση την παρακάτω δράση:



Η απορρόφηση είναι αδιάστατο μέγεθος. Η συγκέντρωση ενός δείγματος, C , εκφράζεται συνήθως σε mol/L (M). Η οπτική διαδρομή ή μήκος κυψελίδας, b , δίνεται συνήθως σε εκατοστόμετρα. Το ε ονομάζεται γραμμομοριακή απορροφητικότητα (ή συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας) και έχει μονάδες $M^{-1} * cm^{-1}$. Η γραμμομοριακή απορροφητικότητα είναι χαρακτηριστικό μέγεθος για κάθε ουσία, και δηλώνει πόσο φως απορροφάται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος [Harris, 2007].

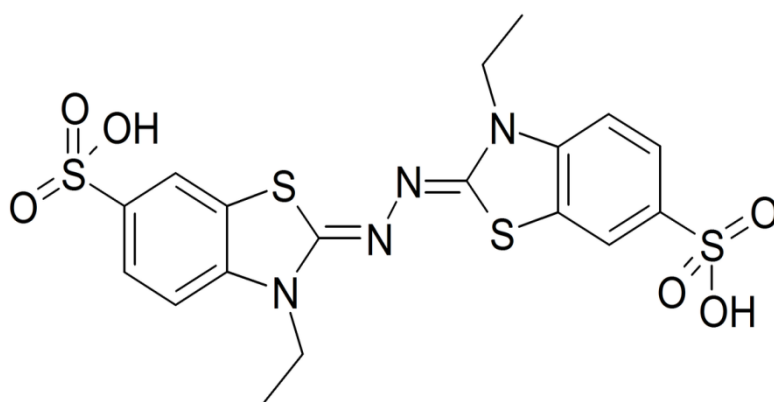
Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit, U), ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για τη πλήρη διάσπαση 1 μ mol υποστρώματος ανά 1 min σε κατάλληλο pH και θερμοκρασία. Η μέθοδος που ακολουθείται για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της λακκάσης είναι η ακόλουθη:

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 250 μ l, προστίθενται 50 μ l δείγμα κατάλληλα αραιωμένο, 175 μ l ρυθμιστικό διάλυμα ($C=0,1 M$) με pH=4 και υπόστρωμα ABTS 25 μ l (σε τελική συγκέντρωση 2mM). Ακολουθεί φωτομέτρηση στο φωτόμετρο SPECTRAmax 250 στα 420 nm και σε θερμοκρασία 30°C. Λαμβάνονται μετρήσεις στα 4, 10 και 14 min

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

Όπως αναφέρθηκε, η ένωση που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα στη μέθοδο αυτή είναι το 2,2'-azinobis-(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) ή αλλιώς ABTS. Το ABTS είναι ένα ψευδο-υπόστρωμα με δομή παρεμφερή με της λιγνίνης. Ο μοριακός του τύπος είναι $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ και η μοριακή του μάζα 514,62 g/mol. Με οξείδωση αυτού του αντιδραστηρίου παράγεται κατιόν $ABTS^+$, το οποίο έχει έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα, που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί φωτομετρικά [Bourbonnais & Paice, 1990].

Ο συντακτικός τύπος του ABTS είναι:



Εικόνα 3.2: Δομή ABTS

Η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση προϊόντος πραγματοποιείται με χρήση του νόμου Beer-Lambert, όπου $\epsilon=36.000 M^{-1} cm^{-1}$ και $b=0,67 cm$.

3.2.1.2. Προσδιορισμός παραγόντων που επηρεάζουν την ενεργότητα της λακκάσης

Η ενεργότητα της λακκάσης επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το pH και την συγκέντρωση του υποστρώματος ABTS. Για να ελεγχθούν οι συνθήκες αυτές, αρχικά παρασκευάζονται 50 ml υγρής καλλιέργειας του μύκητα *Pleurotus citrinopileatus* σε κωνικές φιάλες των 250 ml. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται απόβλητο 50% (v/v), ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.5.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση της θερμοκρασίας ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Σε δοχεία erpendorf προστίθενται 200 ml δείγμα της καλλιέργειας κατάλληλα αραιωμένο με απιονισμένο νερό, 40 ml ABTS συγκέντρωσης 20 mM και 760 ml

ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4. Τα δείγματα αναδεύονται σε vortex. Ακολουθεί επώαση 10 min σε thermomixer και φωτομέτρηση στα 420 nm. Οι θερμοκρασίες που ελέγχθηκαν είναι 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 °C.

Για να προσδιοριστεί η επίδραση του pH ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 250 μl προστίθενται 50 μl δείγμα καλλιέργειας 20 φορές αραιωμένο με απιονισμένο νερό, 25 μl ABTS συγκέντρωσης 20 mM και 175 μl ρυθμιστικό διάλυμα. Χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα με pH 3, 4, 5, 6, 7, 8. Ακολουθεί φωτομέτρηση στο φωτόμετρο SPECTRAmax 250 στα 420 nm και σε θερμοκρασία 25°C. Λαμβάνεται μέτρηση στα 10 min της αντίδρασης.

Για να προσδιοριστεί η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 250 μl προστίθενται 50 μl δείγμα καλλιέργειας 20 φορές αραιωμένο με απιονισμένο νερό, 25 μl ABTS και 175 μl ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4. Χρησιμοποιείται υπόστρωμα με συγκεντρώσεις 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 10 mM. Ακολουθεί φωτομέτρηση στο φωτόμετρο SPECTRAmax 250 στα 420 nm και σε θερμοκρασία 25°C. Λαμβάνεται μέτρηση στα 10 min της αντίδρασης.

3.2.2. Μέτρηση ενεργότητας υπεροξειδασών εξαρτημένων και ανεξάρτητων του μαγγανίου

Η υπεροξειδάση του μαγγανίου (Manganese peroxidase, MnP) ανήκει στην κατηγορία των υπεροξειδασών και είναι γλυκοπρωτεΐνη, που περιέχει μια προσθετική ομάδα αίμης, και ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό.

Η διαφορά της MnP από τις συμβατικές υπεροξειδάσες, είναι ότι το Mn^{2+} είναι ο υποχρεωτικός δότης ηλεκτρονίων για να επανέλθει το ένζυμο 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]. Ακόμα, οι MnP σε σχέση με τις υπεροξειδάσες που είναι ανεξάρτητες από το μαγγάνιο, απαιτούν το μαγγάνιο για να δράσουν, ενώ οι άλλες όχι.

Η διαδικασία μέτρησης της ενεργότητας των συγκεκριμένων υπεροξειδασών είναι η ακόλουθη:

Αρχικά, σε όγκο αντίδρασης 250 μl προστίθενται 125 μl ρυθμιστικό διάλυμα Ηλεκτρικού οξέος-Γαλακτικού νατρίου με pH=4,5 και συγκέντρωση 0,1 M. Έπειτα, προστίθενται 25 μl 2,5-dimethylamino benzoic acid (DMAB) με συγκέντρωση 25 mM, 12,5 μl 3-methyl-2-benzo-triazolinone hydrazone (MBTH) με συγκέντρωση 50 mM και 82,5 μl δείγμα κατάλληλα αραιωμένο. Παρασκευάζονται τρεις τέτοιες

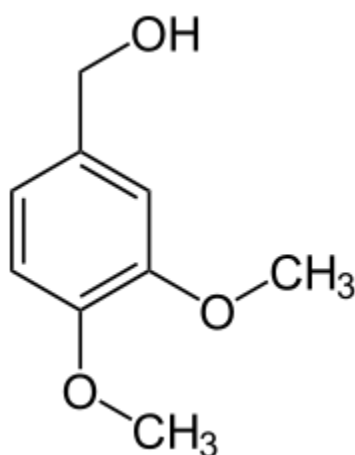
αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση προστίθενται 5 μl απιονισμένο νερό. Το παραπάνω μίγμα αποτελεί το τυφλό διάλυμα. Στην δεύτερη αντίδραση προστίθενται 2,5 μl υπεροξειδίου του υδρογόνου με C=5 mM και 2,5 μl απιονισμένο νερό. Επειδή απουσιάζει το μαγγάνιο, με την παραπάνω αντίδραση προσδιορίζονται οι υπεροξειδάσες που είναι ανεξάρτητες από αυτό. Στην τρίτη αντίδραση προστίθενται 2,5 μl θειικό μαγγάνιο (MnSO₄) με C=10 mM και 2,5 μl υπεροξειδίου του υδρογόνου με C=5 mM. Με την παραπάνω αντίδραση προσδιορίζονται οι υπεροξειδάσες που εξαρτώνται από το μαγγάνιο. Ακολουθεί φωτομέτρηση για 3 min στους 25 °C στα 590 nm.

Η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση προϊόντος πραγματοποιείται με χρήση του νόμου Beer-Lambert, όπου $\epsilon=32.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και $b=0,541 \text{ cm}$.

3.2.3. Μέτρηση ενεργότητας υπεροξειδάσης της λιγνίνης

Η υπεροξειδάση της λιγνίνης (Lignin peroxidase, LiP) 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 μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας, στη παρούσα εργασία, γίνεται με χρήση του υποστρώματος της 3-4 διμεθοξυβενζυλ-αλκοόλης (3-4 dimethoxybenzylalcohol) ή αλλιώς της βερατρυλικής αλκοόλης (veratryl alcohol). Ο μοριακός της τύπος είναι C₉H₁₂O₃ και έχει μοριακό βάρος 168,19 g/mol. Προϊόν της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος είναι η 3-4 διμεθοξυβενζυλ-αλδεύδη. Ο συντακτικός της τύπος παρουσιάζεται παρακάτω.



Εικόνα 3.3: Δομή βερατρυλικής αλκοόλης

Σε όγκο αντίδρασης 2 ml προστίθενται:

- 100 μl ένζυμο κατάλληλα αραιωμένο
- 250 μl βερατρυλική αλκοόλη με C=10 mM

- 1600 μl ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού οξέος-τρυγικού νατρίου με pH=3 και C=0,05 M

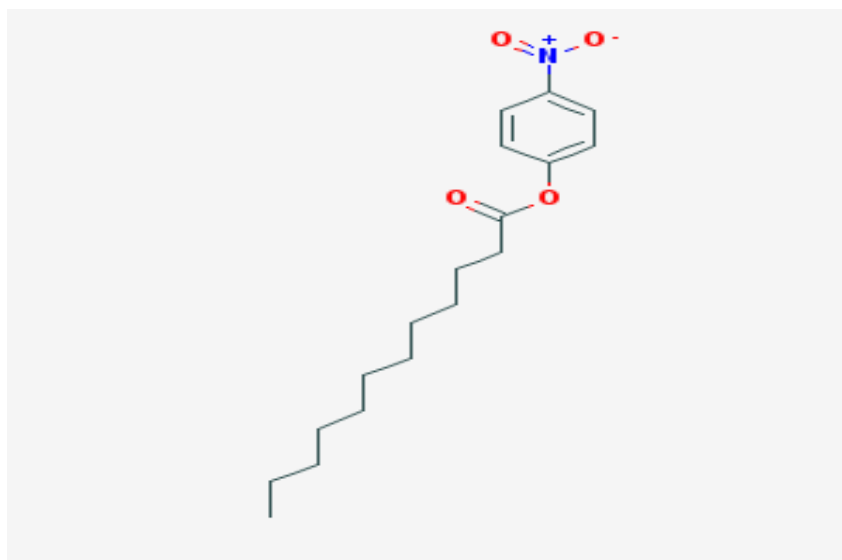
Με την παραπάνω αντίδραση γίνεται μηδενισμός του φωτομέτρου. Ακολουθεί προσθήκη 50 μl H₂O₂ με C=10 mM. Το φωτόμετρο μηδενίζεται και ακολουθεί φωτομέτρηση στους 25 °C, στα 310 nm για 10 min.

Η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση προϊόντος πραγματοποιείται με χρήση του νόμου Beer-Lambert, όπου $\epsilon=9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και $b=1,0 \text{ cm}$.

3.2.4. Μέτρηση ενεργότητας λιπάσης

Οι λιπάσες (EC 3.1.1.3) είναι υδρολυτικά ένζυμα και καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων προς λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Τα ένζυμα αυτά έχουν απομονωθεί από βακτήρια, μύκητες, ζώα και φυτά, ενώ πολλά από αυτά παράγονται λόγω του βιομηχανικού του ενδιαφέροντος σε μεγάλη κλίμακα. Τα φυσικά υποστρώματα των λιπασών είναι αδιάλυτα στο νερό και δρουν σε επιφάνειες νερού-ελαίου. Το σύστημα αυτό, όπου το υπόστρωμα διαλύεται σε έναν μη πολικό οργανικό διαλύτη, καλείται μη συμβατικό σύστημα [Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον., 2013].

Για την ανίχνευση της δραστικότητας της λιπάσης χρησιμοποιήθηκε συνθετικό υπόστρωμα και συγκεκριμένα ο εστέρας της 4-νιτροφαινόλης με το λαυρικό οξύ (p-nitrophenyl laurate, pNp-L). Ο μοριακός τύπος της pNp-L είναι C₁₈N₂₇NO₄ και το μοριακό της βάρος 321,411 g/mol. 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.



Εικόνα 3.4: Δομή pNp-L

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Διάλυμα 1: Ζυγίζονται 90 mg pNp-L και διαλύονται σε 60 ml DMSO
- Διάλυμα 2: Ζυγίζεται 1 g Triton X-100 και 0,5 g Gum Arabic και διαλύονται σε 450 ml ρυθμιστικό διάλυμα K₂HPO₄-Κιτρικό οξύ συγκέντρωσης 50 mM με pH=7

Ακολουθεί ανάμιξη 0,1 ml του Διαλύματος 1 σε 5 ml του Διαλύματος 2. Το τελικό διάλυμα είναι και το υπόστρωμα της αντίδρασης.

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 250 μl, προστίθενται 50 μl δείγμα κατάλληλα αραιωμένο, 100 μl ρυθμιστικό pH=7 και 100 μl υπόστρωμα. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 410 nm στους 30°C για 30 min.

3.2.5. Μέτρηση ολικών φαινολών

Η διάσπαση των φαινολικών ενώσεων του υγρού απόβλητού ελαιουργείου που προέρχεται από τη δράση του εκάστοτε μικροοργανισμού, προσδιορίζεται με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu. Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση όλων των φαινολικών συστατικών, σε αλκαλικό περιβάλλον από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Το αντιδραστήριο αυτό αποτελείται από ένα μίγμα φωσφοροβολφραμικού οξέος (H₃ PW₁₂O₄₀), το οποίο ανάγεται κατά την οξείδωση των φαινολών, σε μίγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W₈O₂₃) και του μολυβδαινίου (Mo₈O₂₃). Το κυανό χρώμα που προκύπτει παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750 nm. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά η μέθοδος.

Παρασκευή διαλύματος Na₂CO₃

Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 100 g Na₂CO₃ σε 400 ml απιονισμένο νερό. Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού υπό ανάδευση και αφήνεται να ψυχθεί. Προστίθενται μερικοί κρύσταλλοι ένυδρου Na₂CO₃ και αφήνεται 24 h σε ηρεμία. Ακολουθεί διήθηση με μεταφορά του διαλύματος σε φιάλη των 500 ml και προστίθεται νερό μέχρι τη χαραγή.

Μέτρηση ολικού φαινολικού φορτίου δείγματος

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται:

- 3,95 ml απιονισμένο H₂O
- 50 μl δείγμα
- 250 μl αντιδραστήριο Folin

Ακολουθεί ανάδευση σε vortex. Το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία για 30 s-8 min και εν συνεχεία προστίθενται 750 μl Na₂CO₃. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex. Το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 30 min σε υδατόλουτρο στους 40 °C. Έπειτα, ακολουθεί φωτομέτρηση στα 765 nm με τυφλό δείγμα (αντί για δείγμα προστίθενται 50 μl νερό). Αν κρίνεται απαραίτητο γίνεται η κατάλληλη αραιώση με απιονισμένο νερό.

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς γίνεται με γαλλικό οξύ και είναι $y=892,08*x$. Η συγκέντρωση των φαινολών μεταφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

3.2.6. Μέτρηση ολικών φαινολών βιομάζας

Στη μέθοδο αυτή, προστίθεται ποσότητα υγρού αζώτου στην παραχθείσα βιομάζα και ακολουθεί κονιορτοποίηση της σε γουδί. Η κονιορτοποιημένη βιομάζα διαλύεται σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος με pH 6. Ακολουθεί επώαση στους 40°C για 15 min και παράλληλα ανάδευση σε vortex ανά 2 min περίπου. Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση της βιομάζας για 15 min. Τέλος, πραγματοποιείται μέτρηση ολικών φαινολών στο υπερκείμενο υγρό όπως περιγράφηκε παραπάνω.

3.2.7. Αποχρωματισμός αποβλήτου

Ο αποχρωματισμός της καλλιέργειας προσδιορίζεται φωτομετρικά με φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302 σε μήκος κύματος 525 nm. Τα δείγματα προηγουμένως αραιώνονται καταλλήλως με απιονισμένο νερό. Το φωτόμετρο μηδενίζεται με το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες, δηλαδή με pH 6. Το ποσοστό αποχρωματισμού προκύπτει από τη σύγκριση του εκάστοτε δείγματος με τον κατάλληλο μάρτυρα.

3.2.8. Μέτρηση βιομάζας

Στο τέλος της καλλιέργειας πραγματοποιείται φυγοκέντρηση της στα 4000 rpm για 20 min. Ακολουθούν όλες οι αναλύσεις στο υπερκείμενο υγρό που προκύπτει.

Το ίζημα που προκύπτει τοποθετείται σε συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying), όπου παραμένει για 24 h και στη συνέχεια ζυγίζεται για να προσδιορισθεί η παραχθείσα βιομάζα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην κατάψυξη του υπό ξήρανση υλικού και κατόπιν στην εξάχνωση του σχηματισθέντος πάγου μέσα στο κατεψυγμένο υλικό, ώστε να παραχθεί το επιθυμητό αφυδατωμένο προϊόν.

3.2.9. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων

Η μέτρηση αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). 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 (Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον., 2013).

Αναλυτικά η μέθοδος έχει ως εξής:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 250 μl δείγματος κατάλληλα αραιωμένο και 250 μl DNS. Το μίγμα αναδεύεται σε vortex και ακολουθεί θέρμανση για 5 min στους 100 °C. Εν συνεχεία προστίθενται 2 ml απιονισμένο νερό, το μίγμα αναδεύεται και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 540 nm με τυφλό δείγμα (αντί για δείγμα προστίθενται 250 μl απιονισμένο νερό). Η απορρόφηση που προκύπτει ανάγεται σε ισοδύναμη συγκέντρωση γλυκόζης με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς. Δίνεται ότι η καμπύλη αναφοράς για τη γλυκόζη είναι $y=1,5506*x$ ($R^2=0,9993$).

3.2.10. Μέτρηση γλυκόζης

Η μέτρηση της γλυκόζης πραγματοποιείται ενζυμικά με τη χρησιμοποίηση ειδικού εμπορικού σκευάσματος (kit). Η μέθοδος βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Η γλυκόζη, αρχικά, με τη δράση της οξειδάσης της γλυκόζης μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή H₂O₂. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, έπειτα, παρουσία αμινοφαιναζόνης και κάποιου φαινολικού παραγώγου με τη δράση της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm [Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον., 2013].

Αναλυτικά η μέθοδος είναι η ακόλουθη:

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 250 μl, προστίθενται 10 μl αποβλήτου κατάλληλα αραιωμένο και 240 μl εμπορικό σκεύασμα. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 510 nm μετά από επώαση στους 37 °C για 15 min. Δίνεται ότι η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης είναι $y=0,9909*x-0,0466$ ($R^2=0,9992$).

3.2.11. Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών

Για τη μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι η χρωστική ένωση Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465 nm όταν είναι μόνη της στο διάλυμα και η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται στα 595 nm όταν είναι προσδεμένη σε πρωτεΐνη. Οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με την πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιονική μορφή που απορροφά στα 595 nm. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη διότι ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλέγματος πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερός σε μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων.

Αναλυτικά η μέθοδος είναι η ακόλουθη:

Σε 1250 μl αντιδραστηρίου Bradford προστίθενται 25 μl δείγματος κατάλληλα αραιωμένο. Στο τυφλό δείγμα προστίθενται 25 μl απιονισμένο νερό. Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 10 min και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595 nm. Δίνεται ότι η καμπύλη αναφοράς της μεθόδου είναι $y=1,0351*x$ ($R^2=0,9734$).

3.2.12. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών αρχικά παρασκευάζονται τα εξής διαλύματα:

Resolving gel 12,5 %

- 1,75 ml απιονισμένο νερό
- 4,7 ml 0,7 M Tris/SDS 0,2% (pH=8,8)
- 2,9 ml 40% bis-acrylamide
- 15 μl 1,2 Bis(dymethylamino)ethane (TEMED)
- 90 μl 10% Ammonium persulfate (APS)

Stacking gel

- 1,5 ml απιονισμένο νερό
- 1,9 ml 0,25 M Tris/SDS 0,2% (pH=6,8)

- 0,38 ml 40% bis-acrylamide
- 10 μl TEMED
- 30 μl 10% APS

Οι παραπάνω αναλογίες αφορούν την παρασκευή ενός gel.

SDS Running buffer

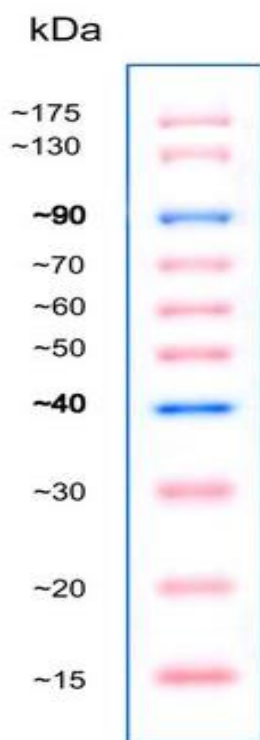
- 10 g/l SDS
- 144 g/l Glycine
- 30,3 g/l Tris

Το παραπάνω ρυθμιστικό αραιώνεται 10 φορές με απιονισμένο νερό.

Native Loading buffer

- 50% Glycerol
- 0,1% Bromophenol blue

Αφού τοποθετηθεί η πλάκα, η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζεται με το SDS Running buffer και τοποθετούνται 20 μl του δείγματος μαζί με 7 μl Loading buffer σε κάθε εσοχή. Συνολικά φορτώνονται 9 εσοχές, 3 εσοχές με δείγμα από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε το *Pleurotus citrinopileatus*, 3 εσοχές από το *Irpex lacteus* και 3 εσοχές με τον μάρτυρα μοριακών βαρών. Στη συσκευή παρέχεται ρεύμα 35 mA/gel για περίπου 1,5 h.



Εικόνα 3.5: Μοριακά βάρη του μάρτυρα

3.2.13. Ζυμογράφημα

Στην παρούσα διπλωματική έγιναν συνολικά δύο ζυμογραφήματα. Κάθε ένα περιγράφεται ξεχωριστά παρακάτω.

I. Υπόστρωμα ABTS

Για τη στερέωση των πρωτεϊνών στο gel, γίνεται εμβάπτιση σε 50 ml οξικού οξέος 10% και μεθανόλης 40% για 10 min. Έπειτα, προστίθενται περίπου 20 ml ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4 και 2,5 ml υπόστρωμα ABTS συγκέντρωσης 20 mM.

II. Υπόστρωμα υπεροξειδίου του υδρογόνου

Για τη στερέωση των πρωτεϊνών στο gel, γίνεται εμβάπτιση σε 50 ml οξικού οξέος 10% και μεθανόλης 40% για 10 min. Ύστερα, προστίθενται περίπου 20 ml ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4,5 και 2 ml DMAB συγκέντρωσης 25 mM, 1 ml MBTH 50 mM, 0,2 ml θειικό μαγγάνιο συγκέντρωσης 10 mM και 0,2 ml υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκέντρωσης 5 mM. Με αυτόν τον τρόπο αναμένεται η ανίχνευση των οι πρωτεϊνών που εξαρτώνται από το μαγγάνιο. Η αντίστοιχη διαδικασία εφαρμόζεται και για τις πρωτεΐνες που δεν εξαρτώνται από το μαγγάνιο, χωρίς όμως την προσθήκη του μαγγανίου. Στη θέση του προστίθενται απιονισμένο νερό.

Το gel αφήνεται για επώαση μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.

3.2.14. Χρώση πρωτεϊνών

Με τη μέθοδο Silver Staining γίνεται χρώση όλων των πρωτεϊνών του δείγματος. Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Silver Staining

Αρχικά, γίνεται στερέωση των πρωτεϊνών στο gel και παραμονή του για 90 min σε διάλυμα 50% μεθανόλης και 12% οξικού οξέος. Έπειτα, γίνεται απομάκρυνση του οξικού ως εξής. Το gel εμβαπτίζεται για 20 min σε 50 ml 50% αιθανόλη. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές. Ακολουθεί πλύση με 50 ml 30% αιθανόλη για 30 min και ξέπλυμα με νερό. Το gel επώάζεται με διάλυμα διθειονώδους νατρίου (*sodium dithionate*) περιεκτικότητας 0,02% και έπειτα ξεπλένεται 3 φορές με απιονισμένο νερό. Ύστερα, εμβαπτίζεται το gel σε 25 ml διαλύματος νιτρικού αργύρου 0,2% και φορμαλδεΐδης 0,075% για 20 min. Ακολουθεί ξέπλυμα με νερό για 20 sec 2 φορές. Η εμφάνιση των ζωνών στο gel γίνεται με χρήση διαλύματος ανθρακικού νατρίου 6%, φορμαλδεΐδης 0,05% και διθειονώδους νατρίου 0,02%. Μετά την εμφάνιση των ζωνών επιβραδύνεται η χρώση με εμβάπτιση του gel σε απιονισμένο νερό για 10 min και ολοκληρώνεται με χρήση του διαλύματος στερέωσης για 10 min.

3.3 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ

Ως θρεπτικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών χρησιμοποιείται υγρό απόβλητο ελαιουργείου, συγκεκριμένα κασίγαρος, το οποίο προηγουμένως πρέπει να υποστεί κατεργασία.

Η προκατεργασία του αποβλήτου περιλαμβάνει ρύθμιση του pH του στο 6 με τη χρήση NaOH 2M. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του αποβλήτου για 20 min στους 4 °C και σε 4000 rpm. Το μίγμα έπειτα από τη φυγοκέντρηση αποτελείται από τρεις φάσεις, το ίζημα, το απόβλητο (υπερκείμενο) και την άνω φάση που είναι κυρίως το λάδι. Παραλαμβάνεται με τη βοήθεια σιφωνίου το υπερκείμενο και ακολουθεί διήθηση υπό κενό με διηθητικό χαρτί. Το διήθημα φυλάσσεται στους -20 °C για περαιτέρω χρήση.

Παρασκευή NaOH συγκέντρωσης 2 M

Ζυγίζονται 8 g NaOH σε 100 ml απιονισμένου νερού. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται σε ηρεμία για μερικά λεπτά. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση το μοριακό βάρος του καυστικού νατρίου, το οποίο είναι 40 g/mol για συγκέντρωση διαλύματος 1 M.

3.4 ΣΤΕΡΕΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Αρχικά, οι στερεές καλλιέργειες των Βασιδιομυκήτων πραγματοποιούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar). Τα τρυβλία αυτά χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό νέων τρυβλίων με υπόστρωμα το απόβλητο σε συγκέντρωση 25% (v/v) αραιωμένο με ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6. Όλοι οι εμβολιασμοί γίνονται σε στείρες συνθήκες. Ο μέσος χρόνος ανάπτυξης των Βασιδιομυκήτων στα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα το απόβλητο είναι 7-10 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου.

3.5 ΥΓΡΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Οι καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε γυάλινες κωνικές φιάλες των 250 ml. Το απόβλητο, που αποτελεί το θρεπτικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια, χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 25% (v/v) αραιωμένο με ρυθμιστικό διάλυμα με pH=6. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιείται για το *Pleurotus citrinopileatus* Corn steep liquor συγκέντρωσης 30 g/l και για το *Irpex lacteus* τρυγικό διαμμόνιο (C₄H₁₂N₂O₆) μοριακού βάρους 184,15 g/mol. Εξετάζονται οι εξής συγκεντρώσεις πηγής αζώτου: 0, 5, 10, 20, 30, 50 g/l και για τα δύο στελέχη. 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 60 ml. Ακολουθεί αποστείρωση των κωνικών σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 min. Έπειτα, τα υποστρώματα εμβολιάζονται με τον μικροοργανισμό σε στείρες συνθήκες. Ο εμβολιασμός γίνεται με κομμάτι μικροοργανισμού μεγέθους 1 cm², κομμένο από τρυβλίο με το ίδιο υπόστρωμα. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 25°C υπό ανάδευση (150 rpm) σε επωαστήρα. Η καλλιέργεια διαρκεί 22 ημέρες.

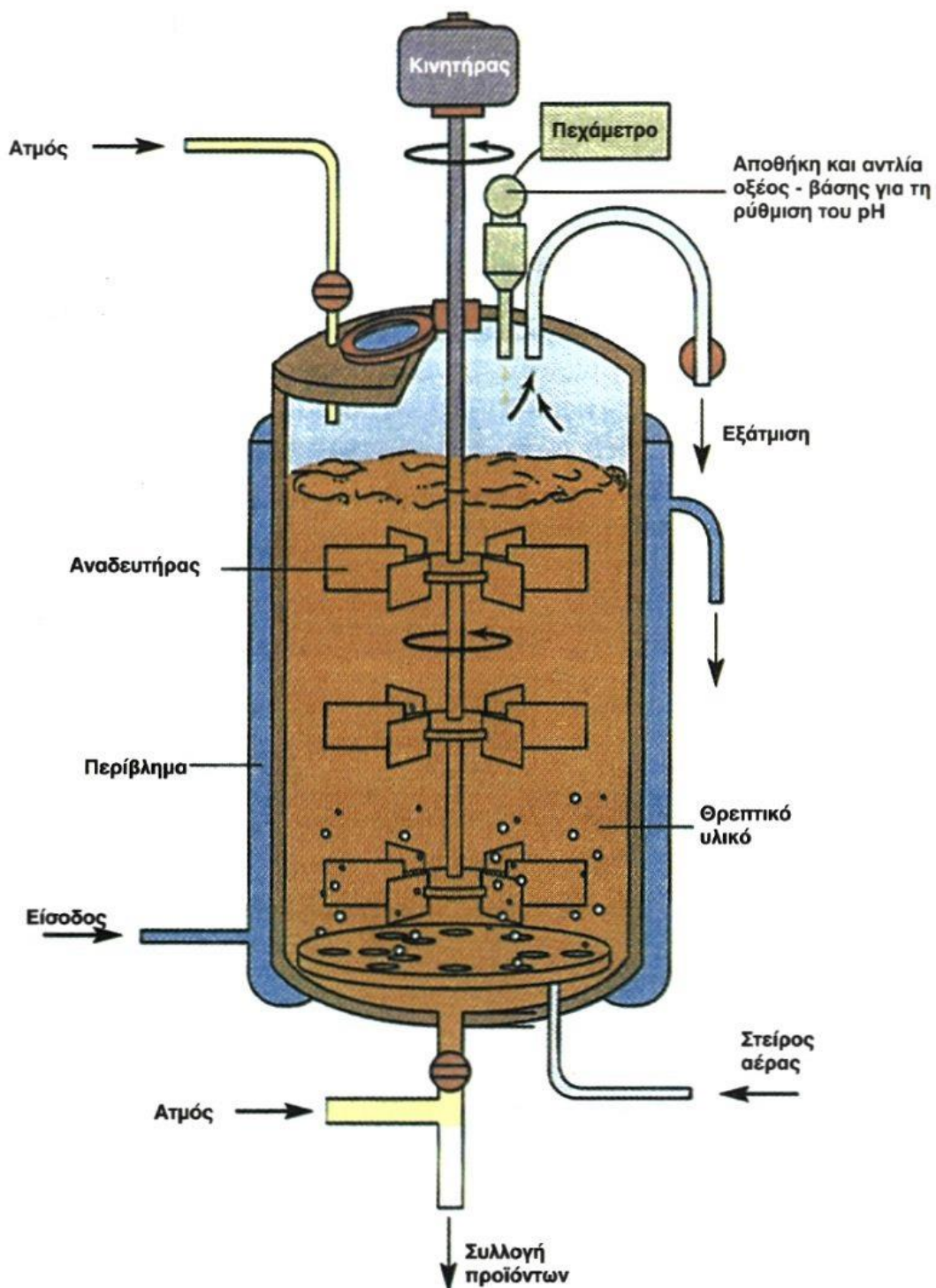
Καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας λαμβάνεται δείγμα 1 ml από κάθε κωνική φιάλη ανά τακτά χρονικά διαστήματα, το οποίο εν συνεχεία φυγοκεντρείται για 10 min. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε φιαλίδια erpendorf και χρησιμοποιείται για τις μετέπειτα αναλύσεις. Η δειγματοληψία πραγματοποιείται τις ακόλουθες ημέρες της καλλιέργειας: 3η,5η, 7η,10η,13η,16η,19η,22η ημέρα. Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιούνται οι προαναφερθείσες αναλύσεις.

3.6 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ

Οι βιοαντιδραστήρες (*bioreactors*) είναι διατάξεις με τις οποίες εξασφαλίζονται οι απαιτούμενες συνθήκες για την δράση ζωντανών κυττάρων ή συστατικών τους (κυρίως ένζυμα) με σκοπό τη μετατροπή των τροφοδοτούμενων υποστρωμάτων σε επιθυμητά προϊόντα. Οι βασικές λειτουργίες που επιτελούν οι βιοαντιδραστήρες που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη κυττάρων είναι:

- Διασφαλίζουν την τροφοδότηση των κυττάρων με απαραίτητα για την επιβίωσή τους συστατικά
- Διατηρούν τις κρίσιμες συνθήκες του περιβάλλοντος των κυττάρων στο επιθυμητό επίπεδο
- Περιορίζουν την ανταλλαγή μικροοργανισμών ανάμεσα στο χώρο της ζύμωσης και στο περιβάλλον
- Επιτρέπουν την παρακολούθηση παραμέτρων που είναι ενδεικτικές της πορείας της διεργασίας
- Εγγυώνται την ασφάλεια των χειριστών κατά τη διάρκεια λειτουργίας της συσκευής

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.6) απεικονίζεται ένας τυπικός ζυμωτήρας υγρής καλλιέργειας. Το δοχείο του βιοαντιδραστήρα είναι συνήθως εξοπλισμένο με γυάλινο τοίχωμα που επιτρέπει την οπτική επαφή με το υγρό της ζύμωσης, και ταυτόχρονα διαθέτει πλευρικές υποδοχές για τα αισθητήρια όργανα μέτρησης του pH, της θερμοκρασίας και του διαλυμένου οξυγόνου. Το στεγανοποιημένο καπάκι του δοχείου διαθέτει ειδικά ανοίγματα έτσι ώστε να εισέρχονται τα κύτταρα του μικροοργανισμού που αποτελούν το εμβόλιο, οι απαραίτητες για τη ρύθμιση του pH ποσότητες οξέος ή βάσεως, καθώς και αντιαφριστικές ουσίες σε περίπτωση που παρατηρείται αφρισμός. Ο αέρας εισέρχεται συνήθως κοντά στον πυθμένα του δοχείου μέσα από κατάλληλης διαμέτρου οπές, ενώ η ανάδευση πραγματοποιείται με τη βοήθεια συστήματος μετάδοσης της κίνησης από τον κινητήρα σε εφοδιασμένο με πτερύγια άξονα. Η θερμοκρασία του μέσου ανάπτυξης ρυθμίζεται με εξωτερικό ή εσωτερικό μανδύα ανάμεσα στους οποίους κυκλοφορεί το θερμαντικό μέσο. Η έξοδος του αέρα γίνεται μέσα από φίλτρο για την αποφυγή απελευθέρωσης κυττάρων του μικροοργανισμού στο περιβάλλον, ενώ η συλλογή του υγρού μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης πραγματοποιείται με ειδική θυρίδα στον πυθμένα του δοχείου [Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον.,2013].



Εικόνα 3.6: Τυπικός βιοαντιδραστήρας υγρής καλλιέργειας

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετάται η διεργασία διαλείποντος έργου (*batch system*) για την ανάπτυξη του Βασιδιομύκητα *Pleurotus citrinopileatus* υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Χρησιμοποιήθηκε βιοαντιδραστήρας BIOFLO & CELLIGEN 310 όγκου 2 L, εφοδιασμένος με ηλεκτρονικά συστήματα μέτρησης και ελέγχου της

θερμοκρασίας, του pH, της ταχύτητας ανάδευσης, της παροχής αέρα, της συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου και του αφρισμού.

Το μέσο ανάπτυξης όγκου 1,5 L περιέχει 375 ml επεξεργασμένου υγρού αποβλήτου, 1125 ml ρυθμιστικό διάλυμα pH=6, C=0,1 M και πηγή αζώτου 45 g corn steep liquor. Ο αντιδραστήρας εμβολιάζεται με 100 ml προκαλλιέργειας του Βασιδιομύκητα που έχει αναπτυχθεί στο ίδιο μέσο σε αναδευόμενες κωνικές φιάλες των 250 ml για περίπου 15 ημέρες. Η θερμοκρασία ανάπτυξης στο βιοαντιδραστήρα είναι 30 °C.

Ανά 24 h λαμβάνονται περίπου 5 ml δείγματος. Συνολικά ελήφθησαν 6 δείγματα, στα οποία πραγματοποιήθηκαν όλες οι παραπάνω αναλύσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΠΕΙΡΑΜΑ 1: ΣΥΣΤΑΣΗ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ

Στο απόβλητο έγιναν οι παρακάτω μετρήσεις, μετά την προκατεργασία:

- I. Μέτρηση pH
- II. Μέτρηση ολικών φαινόλων
- III. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων
- IV. Μέτρηση γλυκόζης
- V. Οπτική απορρόφηση στα 525 nm
- VI. Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών

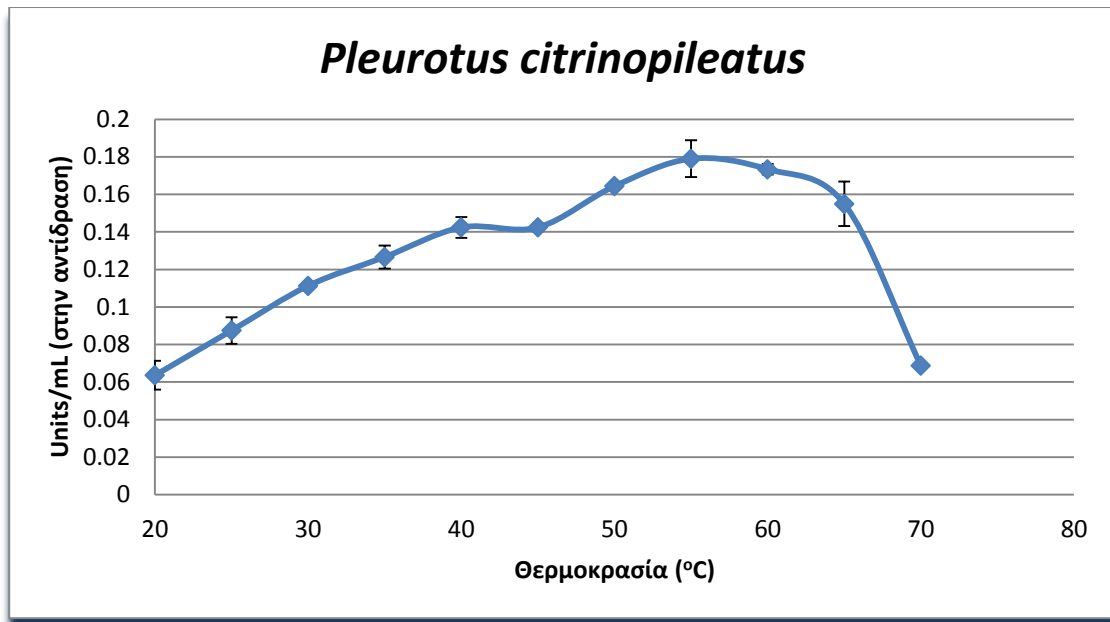
Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων.

Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα σύστασης κασίγαρου

pH	5,95
Ολικές φαινόλες (ppm γαλλικού οξέος)	3751,2 ± 0,33
Αναγωγικά σάκχαρα (g/l)	24,79 ± 0,69
Γλυκόζη (g/l)	15,31±1,90
Οπτική απορρόφηση στα 525 nm (αραίωση 1:100)	0,423
Ολικές πρωτεΐνες (g/l)	3,204 ± 0,28

4.2 ΠΕΙΡΑΜΑ 2: ΕΥΡΕΣΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΛΑΚΚΑΣΗΣ

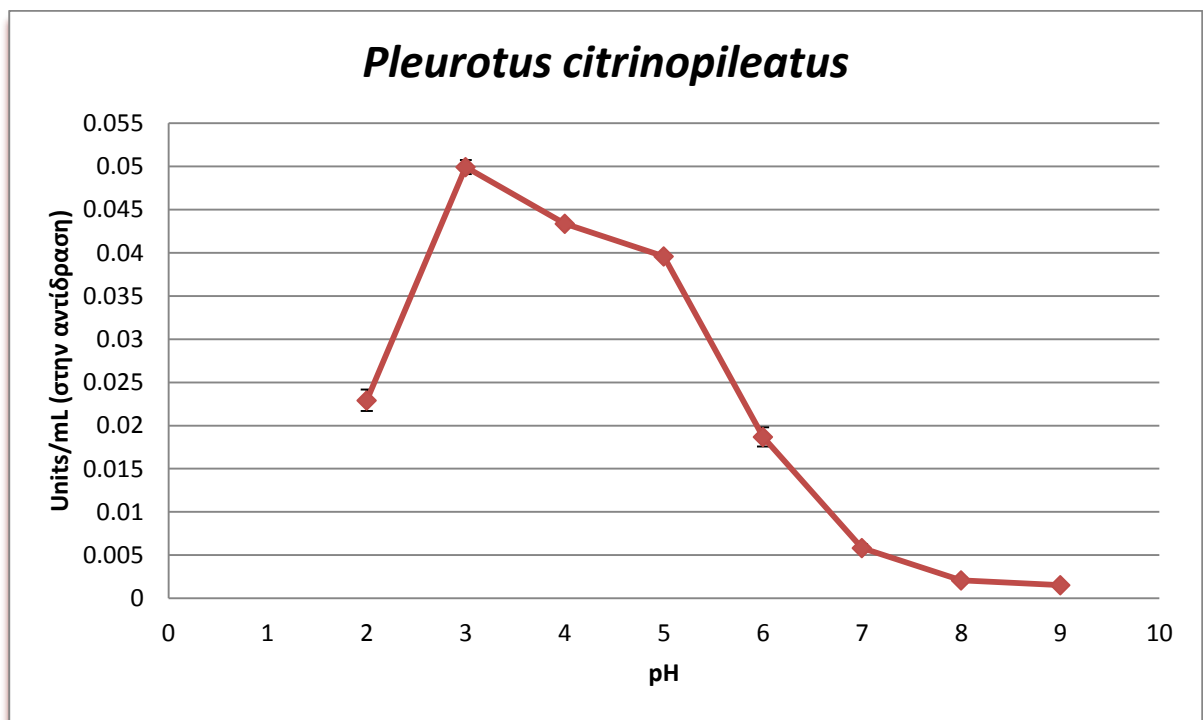
Σε υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας του μύκητα *Pleurotus citrinopileatus* μελετάται η επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και της συγκέντρωσης υποστρώματος στην ενεργότητα του ενζύμου λακκάσης. Στην Εικόνα 4.1 παρουσιάζεται η ενεργότητα του ενζύμου συναρτήσει της θερμοκρασίας.



Εικόνα 4.1: Ενεργότητα λακκάσης συναρτήσει της θερμοκρασίας

Παρατηρείται ότι, στη θερμοκρασία 55 °C το ένζυμο εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας η οποία είναι **0,179±0,006 Units/ml**.

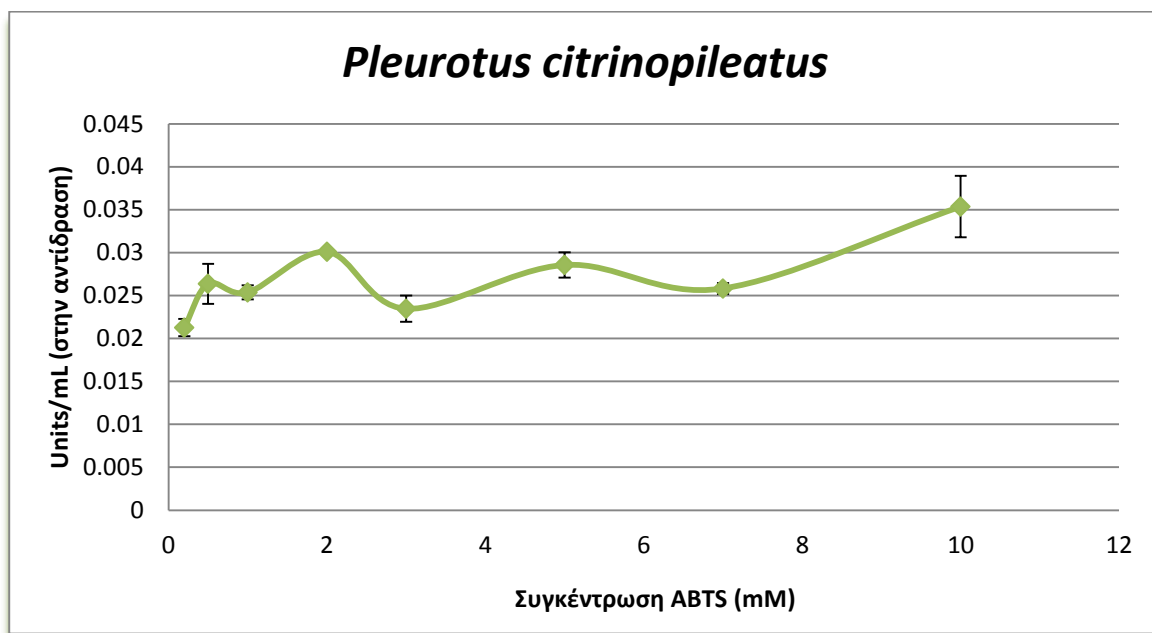
Στην Εικόνα 4.2 παρουσιάζεται η ενεργότητα του ενζύμου συναρτήσει του pH.



Εικόνα 4.2: Ενεργότητα λακκάσης σε σχέση με το pH

Παρατηρείται ότι, για pH 3 το ένζυμο εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας η οποία είναι **0,049±0,001 Units/ml**.

Στην Εικόνα 4.3 παρουσιάζεται η ενεργότητα του ενζύμου συναρτήσει της συγκέντρωσης υποστρώματος ABTS.



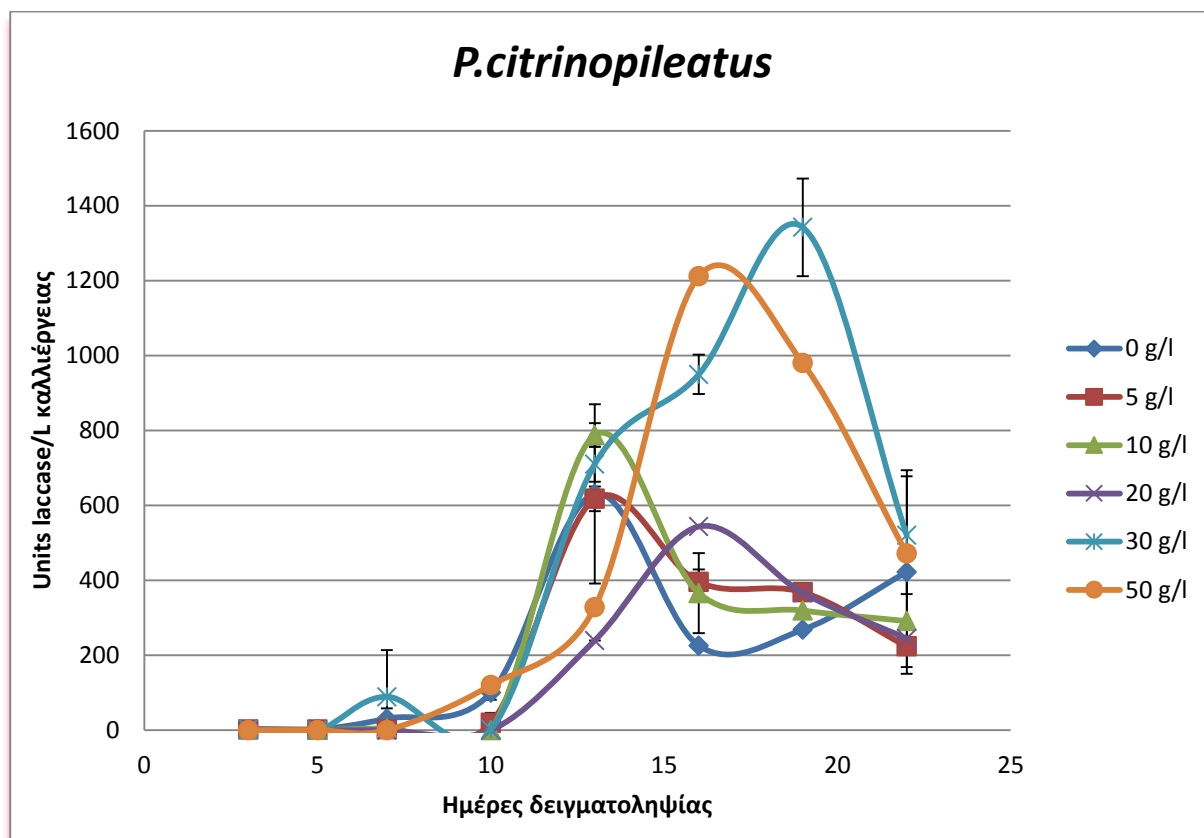
Εικόνα 4.3: Ενεργότητα λακκάσης σε σχέση με τη συγκέντρωση υποστρώματος

Παρατηρείται ότι, για συγκέντρωση 10 mM το ένζυμο εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας η οποία είναι **0,035±0,002 Units/ml**.

4.3 ΠΕΙΡΑΜΑ 3: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΗΓΗΣ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *P.citrinopileatus*

4.3.1. Ενεργότητα λακκάσης

Στην Εικόνα 4.4 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης αζώτου στην ενεργότητα του ενζύμου λακκάσης.

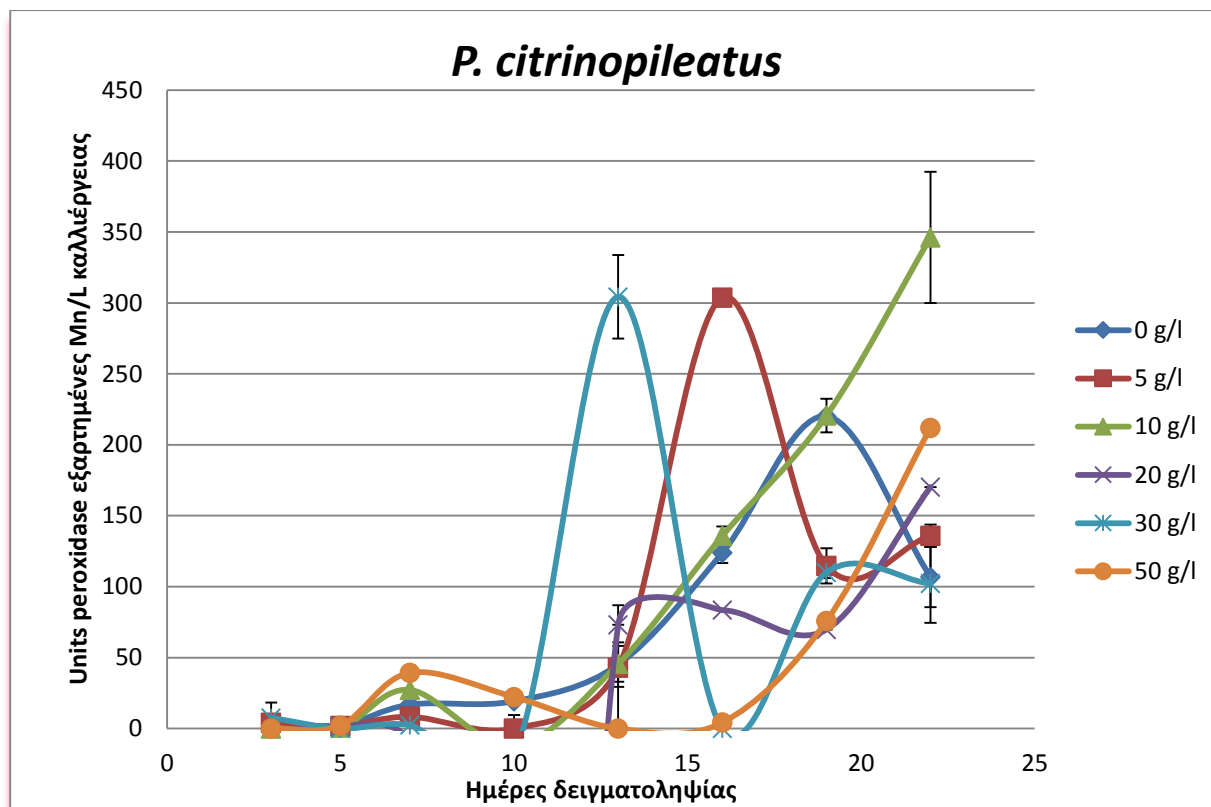


Εικόνα 4.4: Ενεργότητα λακκάσης από το μύκητα *P.cintrinopileatus*

Η μέγιστη ενεργότητα παρατηρείται την 19^η ημέρα για συγκέντρωση αζώτου 30 g/l και είναι **1342,57±130,13 Units/L**. Σε όλες τις περιπτώσεις η παραγωγή του ενζύμου ξεκινά από τη 13^η μέρα και μετά και η μέγιστη ενεργότητα του ενζύμου παρατηρείται σε διαφορετική ημέρα καλλιέργειας για την κάθε συνθήκη.

4.3.2. Ενεργότητα υπεροξειδασών εξαρτημένων και ανεξάρτητων μαγγανίου

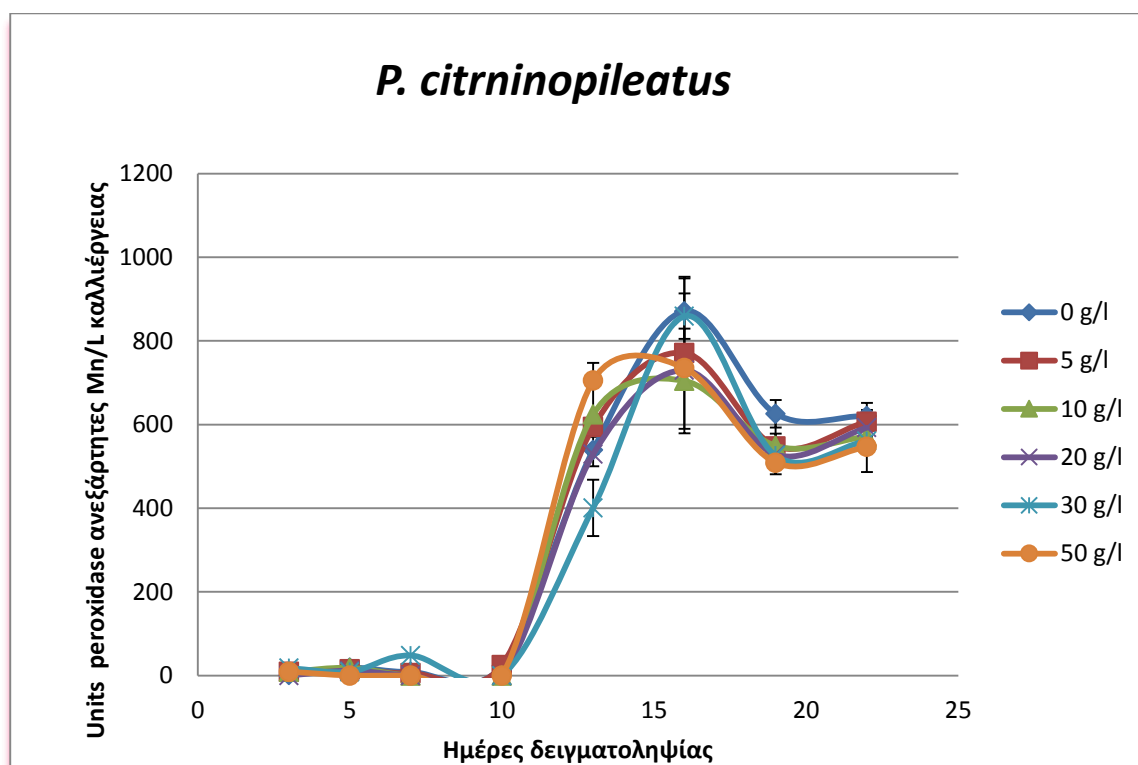
Στην Εικόνα 4.5 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης αζώτου στην ενεργότητα των υπεροξειδασών που εξαρτώνται από το μαγγάνιο.



Εικόνα 4.5: Ενεργότητα υπεροξειδασών που εξαρτώνται από το μαγγάνιο από το μύκητα *P.cintrinopileatus*

Η μέγιστη ενεργότητα παρατηρείται την 22^η ημέρα για συγκέντρωση αζώτου 10 g/l και είναι **346,169±32,833 Units/L**. Εκτός από την συνθήκη 50 g/l που η παραγωγή του ενζύμου ξεκινά την 16^η ημέρα, σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η παραγωγή του ξεκινά την 13^η ημέρα της καλλιέργειας.

Στην Εικόνα 4.6 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης αζώτου στην ενεργότητα των υπεροξειδασών που δεν εξαρτώνται από το μαγγάνιο.



Εικόνα 4.6: Ενεργότητα υπεροξειδασών ανεξαρτήτων του μαγγανίου από το μύκητα *P.cintrinopileatus*

Η μέγιστη ενεργότητα παρατηρείται την 16^η ημέρα για συγκέντρωση αζώτου 30 g/l και είναι **859,131±38,468 Units/L**. Στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές από συνθήκη σε συνθήκη.

4.3.3. Ενεργότητα υπεροξειδάσης της λιγνίνης

Στον παρακάτω πίνακα 4.2 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές ενεργότητας για την κάθε συνθήκη.

Πίνακας 4.2: Μέγιστες τιμές ενεργότητας υπεροξειδάσης της λιγνίνης

Συγκέντρωση πηγής αζώτου (g/l)	Units/L καλλιέργειας	Ημέρα
0	$3,55 \cdot 10^{-8} \pm 1,52 \cdot 10^{-8}$	7 ^η
5	$3,28 \cdot 10^{-8} \pm 3,80 \cdot 10^{-9}$	5 ^η
10	$4,55 \cdot 10^{-7} \pm 5,59 \cdot 10^{-8}$	5 ^η
20	$6,45 \cdot 10^{-8} \pm 4,56 \cdot 10^{-8}$	7 ^η
30	$1,61 \cdot 10^{-8} \pm 7,60 \cdot 10^{-9}$	7 ^η
50	$1,61 \cdot 10^{-8} \pm 7,60 \cdot 10^{-9}$	10 ^η

4.3.4. Μέτρηση βιομάζας

Στον πίνακα 4.3 παρουσιάζονται οι μετρήσεις της βιομάζας για όλες τις συνθήκες στο τέλος της καλλιέργειας, δηλαδή στην 22^η ημέρα.

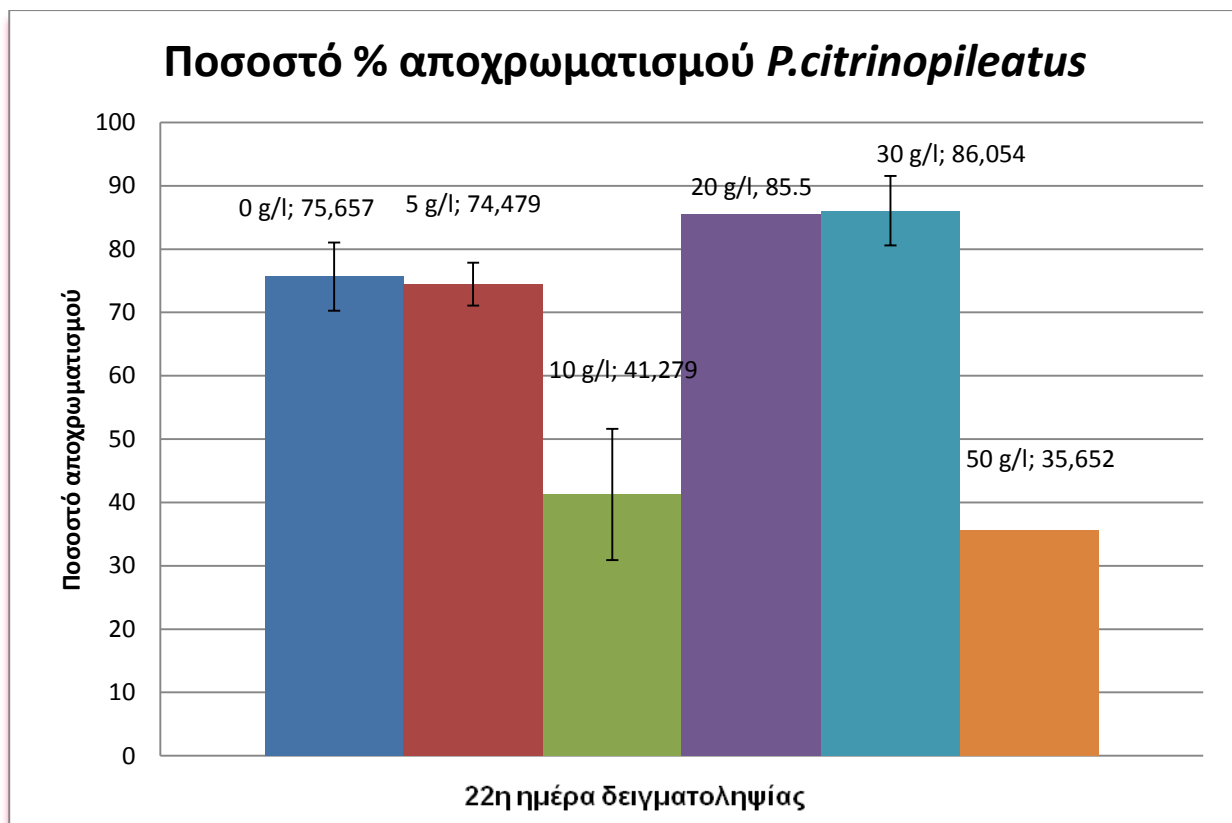
Πίνακας 4.3: Βάρος παραγόμενης βιομάζας

Συγκέντρωση πηγής αζώτου (g/l)	Βιομάζα (mg/ml καλλιέργειας)
0	3,980±0,117
5	6,058±0,392
10	10,442±0,543
20	17,483
30	26,725±1,128
50	34,633

Η μέγιστη τιμή παρατηρείται για συγκέντρωση πηγής αζώτου 50 g/l.

4.3.5. Αποχρωματισμός αποβλήτου

Παρακάτω, παρουσιάζεται η ικανότητα του μύκητα στον αποχρωματισμό του αποβλήτου στο τέλος της καλλιέργειας.

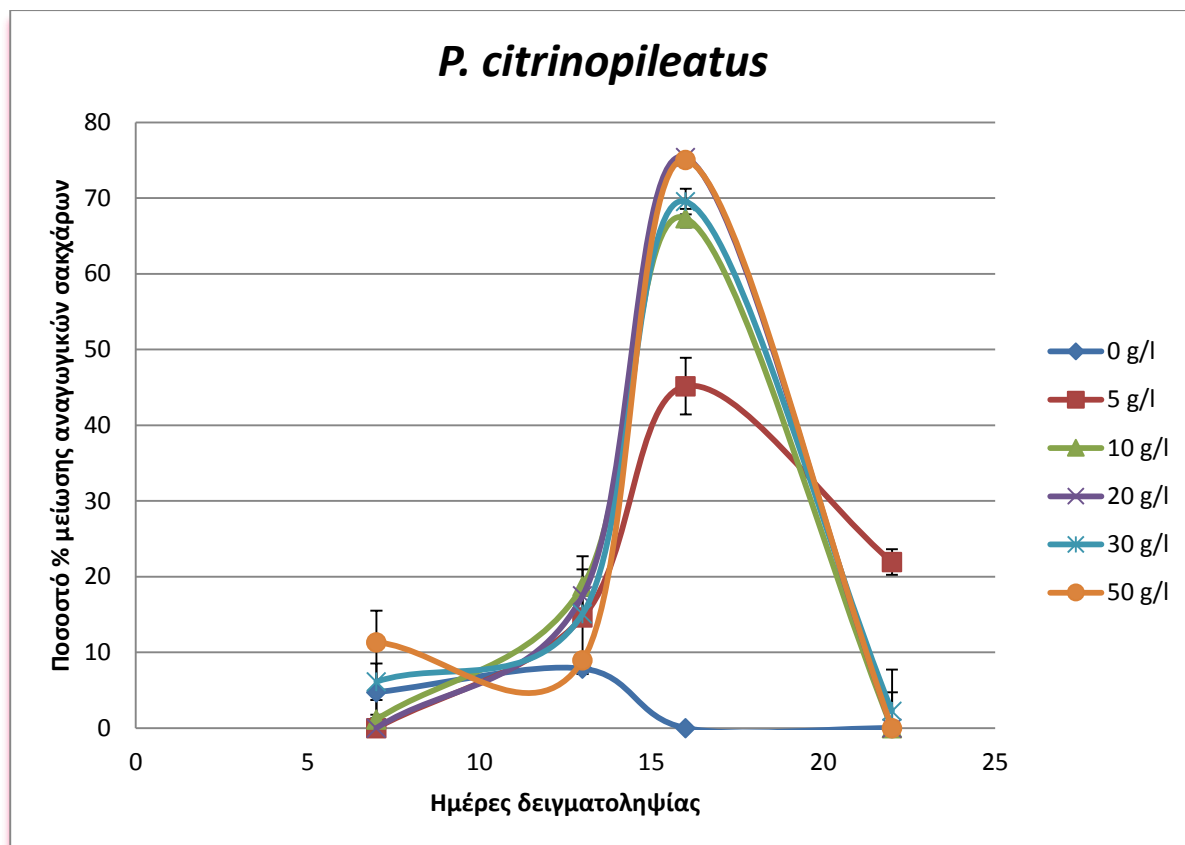


Εικόνα 4.7: Ποσοστό % αποχρωματισμού του αποβλήτου από το μύκητα *P.citrinopileatus*

Το μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού εμφανίζεται για συγκέντρωση πηγής αζώτου 30 g/l με ποσοστό **86,054±5,5%**. Για τις συνθήκες 0, 5 και 20 g/l τα αποτελέσματα είναι εξίσου ικανοποιητικά.

4.3.6. Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων

Παρακάτω, παρουσιάζεται η ικανότητα του μύκητα στην κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων κατά την 7, 13, 16 και 22^η ημέρα καλλιέργειας.

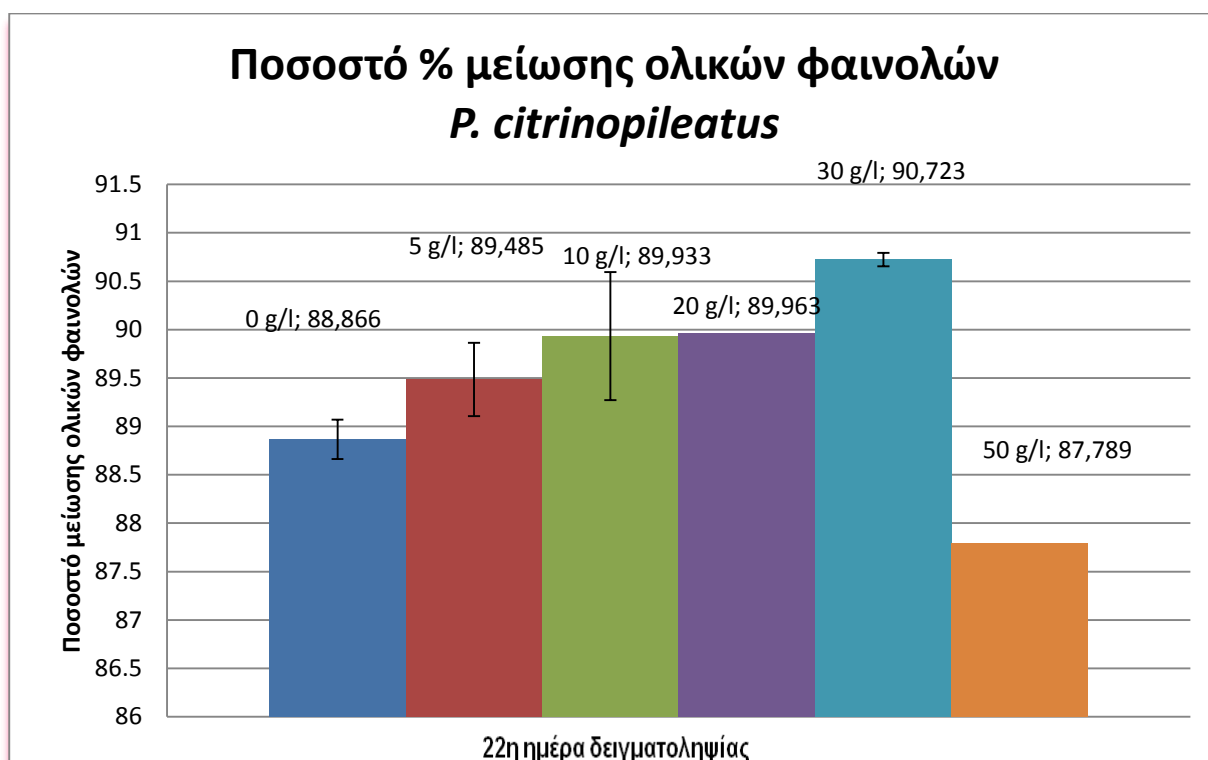


Εικόνα 4.8: Ποσοστό % κατανάλωσης αναγωγικών σακχάρων από το μύκητα *P.cintrinopileatus*

Η βέλτιστη ικανότητα παρουσιάζεται την 16^η ημέρα καλλιέργειας για συγκέντρωση αζώτου 20 g/l και είναι **75,366 % μείωση σακχάρων**. Για τις συνθήκες 10, 30 και 50 g/l τα αποτελέσματα είναι εξίσου ικανοποιητικά χωρίς να εμφανίζουν ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ τους.

4.3.7. Ικανότητα μείωσης ολικών φαινολικών

Στην Εικόνα 4.9 παρουσιάζεται η ικανότητα του μύκητα στη μείωση των φαινολικών ενώσεων στο τέλος της καλλιέργειας.



Εικόνα 4.9: Ποσοστό % κατανάλωσης ολικών φαινολικών από το μύκητα *P.cintrinopileatus*

Η βέλτιστη ικανότητα στην αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων εμφανίζεται στη συγκέντρωση πηγής αζώτου 30 g/l με ποσοστό **90,723±0,048 %** μείωσης φαινολικών ενώσεων. Για τις υπόλοιπες συνθήκες τα αποτελέσματα είναι εξίσου ικανοποιητικά.

4.3.8. Μείωση φαινολών βιομάζας

Στον πίνακα 4.4 παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ολικών φαινολών της βιομάζας για συγκέντρωση πηγής αζώτου 30 g/l την 22^η ημέρα καλλιέργειας. Η απορρόφηση των φαινολών από τη βιομάζα αναφέρεται ενδοκυτταρικά, ενώ τα mg φαινολών/g βιομάζας που καταναλώθηκαν αναφέρονται εξωκυτταρικά.

Πίνακας 4.4: Βάρος φαινολών στη βιομάζα

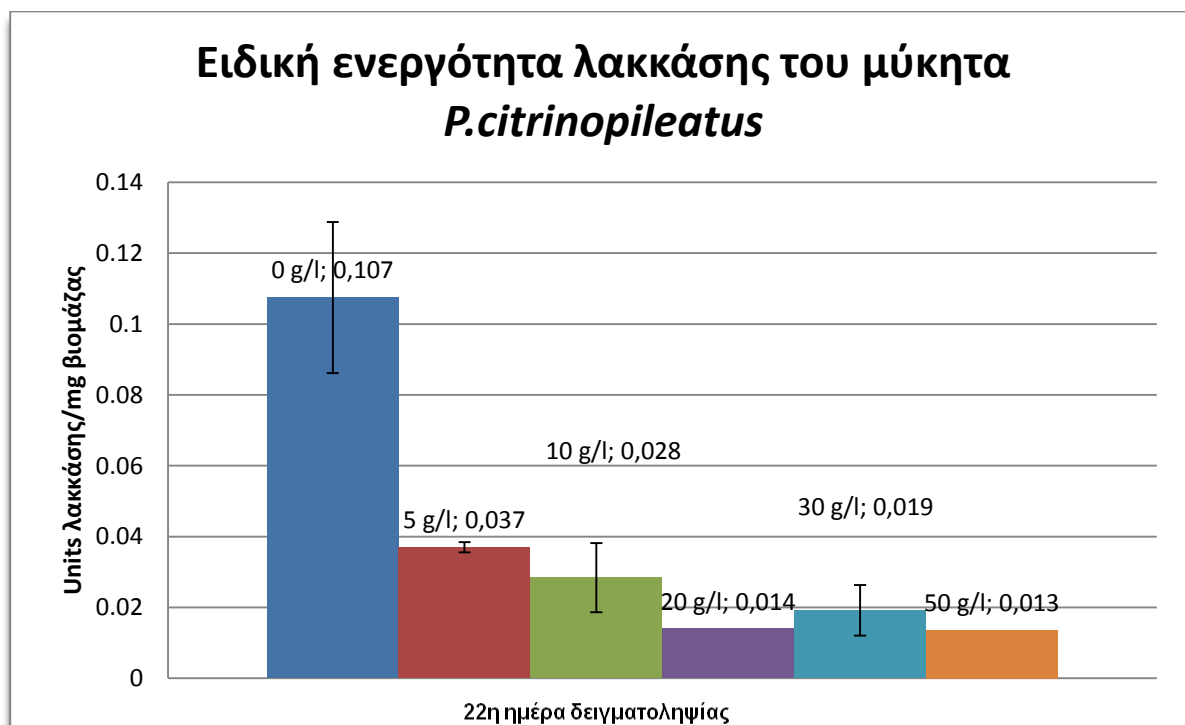
Συγκέντρωση πηγής αζώτου (g/l)	mg φαινολών/g βιομάζας	
	Ενδοκυτταρικά	Εξωκυτταρικά
30	4,512±0,288	37,099±1,340

4.3.9. Μέτρηση λιπασών

Για τον υπολογισμό της ενζυμικής ενεργότητας των λιπασών, εξετάστηκαν όλες οι συνθήκες την 3, 10, 16 και 22^η ημέρα της καλλιέργειας. Για συγκέντρωση πηγής αζώτου 50 g/l την 16^η ημέρα μετρήθηκε η μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας των λιπασών η οποία είναι **3,88 Units/l** στην καλλιέργεια. Για τα υπόλοιπα δείγματα και για όλες τις συνθήκες δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα του ενζύμου.

4.3.10. Ειδική ενεργότητα

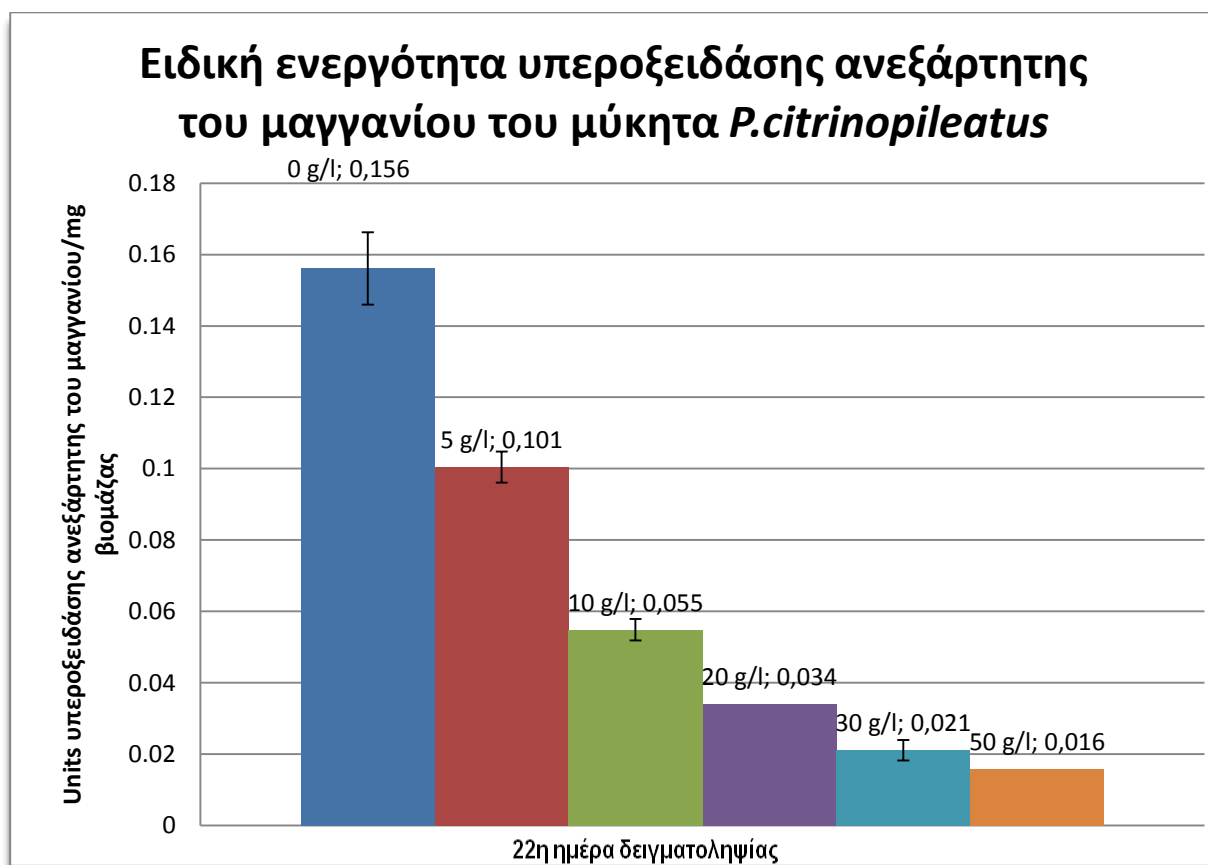
Στην παρακάτω Εικόνα 4.10 παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα για τη λακκάση κατά το τέλος της καλλιέργειας, δηλαδή την 22^η ημέρα.



Εικόνα 4.10: Ειδική ενεργότητα λακκάσης από το μύκητα *P.citrinopileatus* την 22^η ημέρα καλλιέργειας

Από την παραπάνω εικόνα συνεπάγεται ότι απουσία αζώτου το ένζυμο εκφράζεται πιο έντονα από ότι στις άλλες συνθήκες. Συγκεκριμένα, κατά τη συνθήκη 0 g/l το ένζυμο εμφανίζει ειδική ενεργότητα **0,107±0,021 Units /mg βιομάζας**.

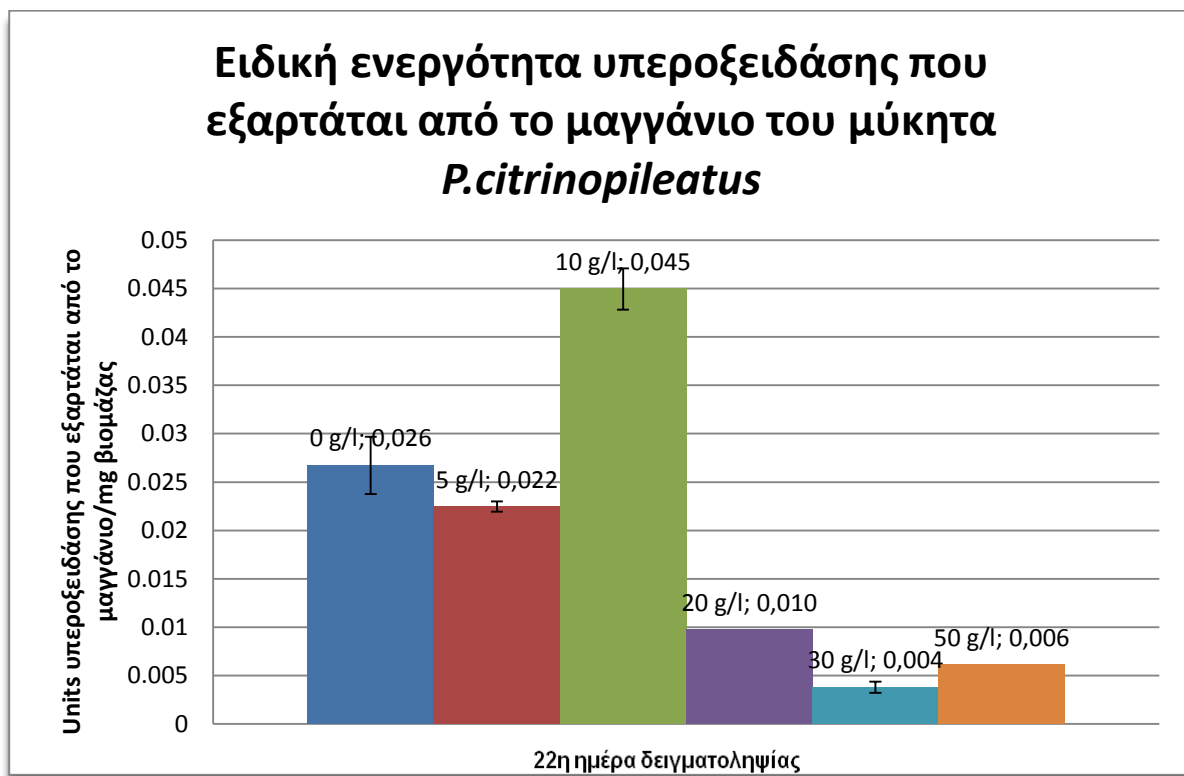
Στην Εικόνα 4.11 παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα της υπεροξειδάσης που δεν εξαρτάται από το μαγγάνιο την 22^η ημέρα καλλιέργειας.



Εικόνα 4.11: Ειδική ενεργότητα υπεροξειδάσης που δεν εξαρτάται από το μαγγάνιο του μύκητα *P.citrinopileatus* την 22^η ημέρα καλλιέργειας

Από την παραπάνω εικόνα προκύπτει και πάλι το συμπέρασμα ότι απουσία αζώτου υπάρχει εντονότερη έκφραση της υπεροξειδάσης που εξαρτάται από το μαγγάνιο. Η ειδική ενεργότητα αυτής της συνθήκης είναι **0,156±0,010 Units/mg βιομάζας**. Η ειδική ενεργότητα μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση πηγής αζώτου.

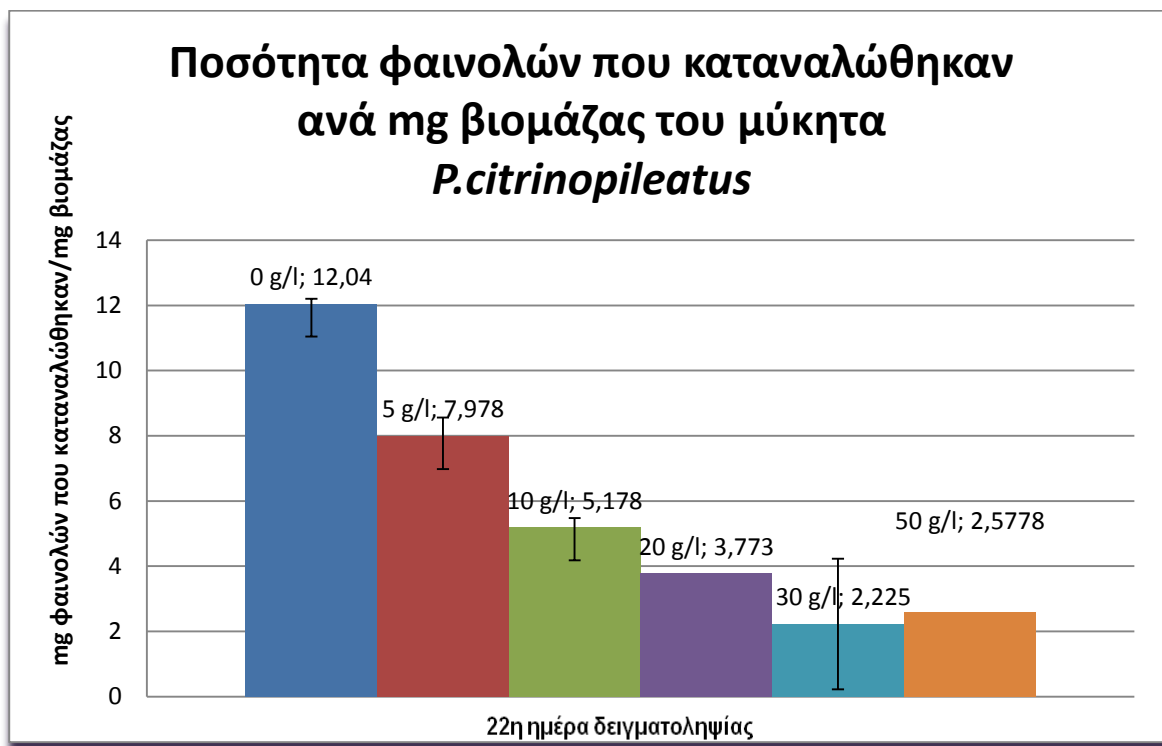
Στην Εικόνα 4.12 παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα της υπεροξειδάσης που εξαρτάται από το μαγγάνιο την 22^η ημέρα καλλιέργειας.



Εικόνα 4.12: Ειδική ενεργότητα υπεροξειδάσης που εξαρτάται από το μαγγάνιο του μύκητα *P.citrinopileatus* την 22^η ημέρα καλλιέργειας

Μεγαλύτερη τιμή ειδικής ενεργότητας παράγεται σε συγκέντρωση πηγής αζώτου 10 g/l η οποία είναι **0,045±0,002 Units/mg βιομάζας**.

Στην Εικόνα 4.13 παρουσιάζεται η καταναλωθείσα ποσότητα φαινολών ανά ποσότητα βιομάζας στο τέλος της καλλιέργειας.



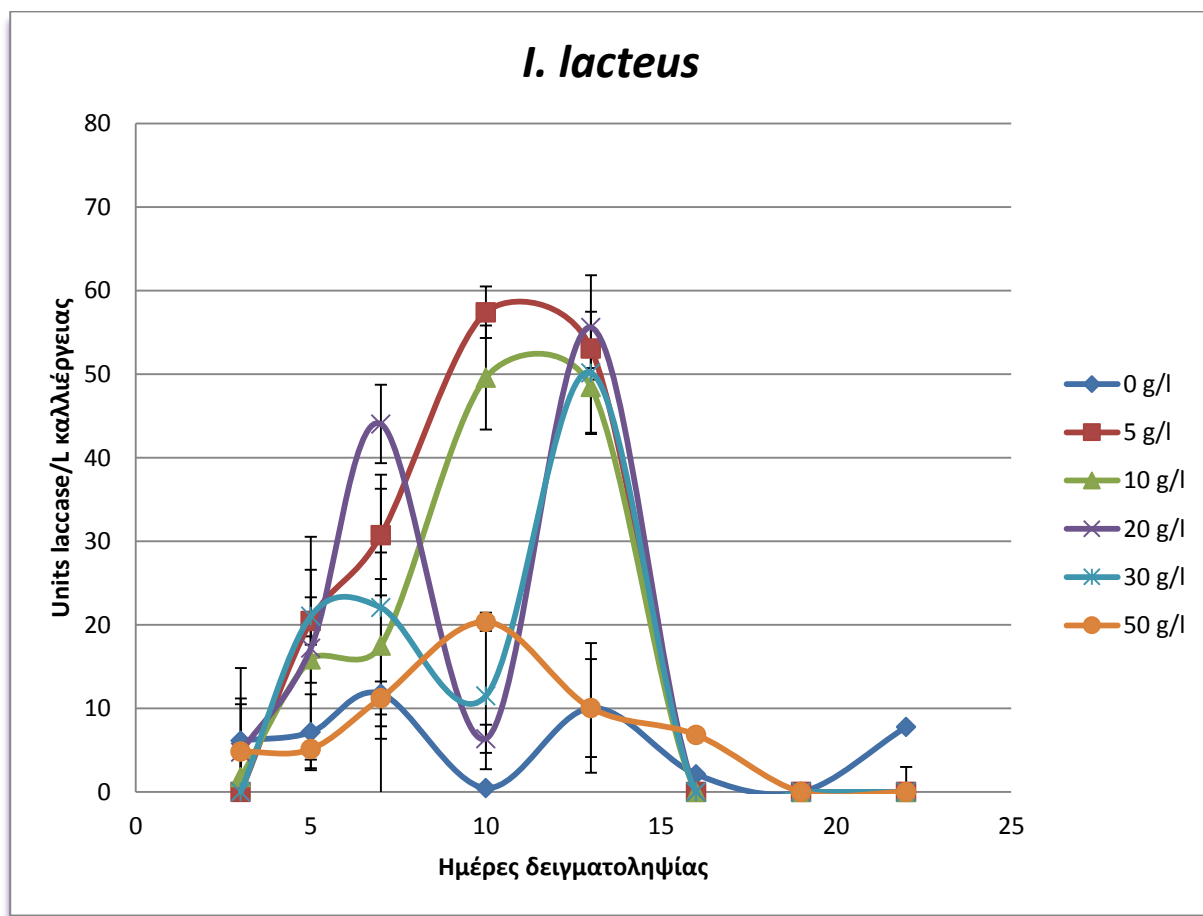
Εικόνα 4.13: Καταναλωθείσα ποσότητα φαινολών του μύκητα *P.citrinopileatus* την 22^η ημέρα καλλιέργειας

Στην συνθήκη 0 g/l η ποσότητα φαινολών που καταναλώνεται ανά μονάδα βιομάζας παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση πηγής αζώτου τόσο μειώνεται η τιμή αυτή.

4.4 ΠΕΙΡΑΜΑ 4: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΗΓΗΣ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *I.lacteus*

4.4.1. Ενεργότητα λακκάσης

Στην Εικόνα 4.14 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης αζώτου στην ενεργότητα του ενζύμου λακκάσης.

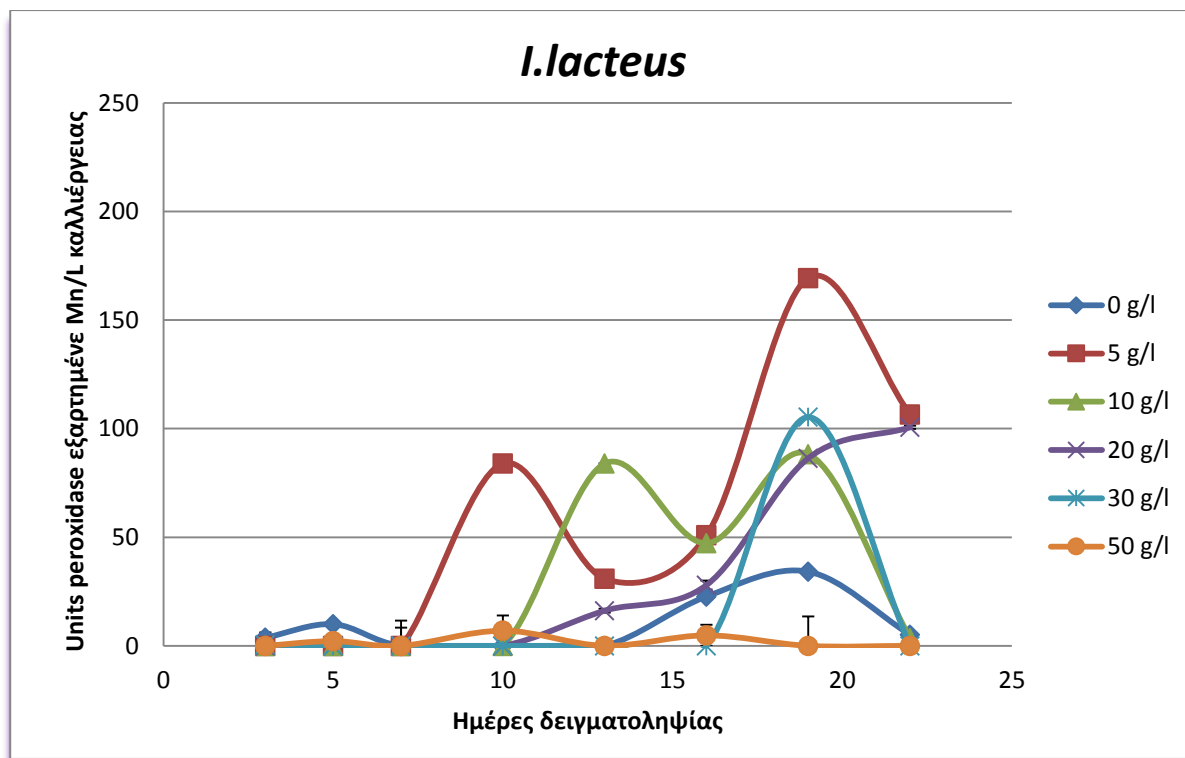


Εικόνα 4.14: Ενεργότητα λακκάσης του μύκητα *I.lacteus*

Η μέγιστη ενεργότητα παρατηρείται την 10^η ημέρα για συγκέντρωση αζώτου 5 g/l και είναι **57,421±3,078 Units/L**. Στη συγκεκριμένη εικόνα παρατηρούνται πολλές διαφορές μεταξύ των συνθηκών, όσον αφορά στην ενεργότητα του ενζύμου.

4.4.2. Ενεργότητα υπεροξειδασών εξαρτημένων και ανεξάρτητων μαγγανίου

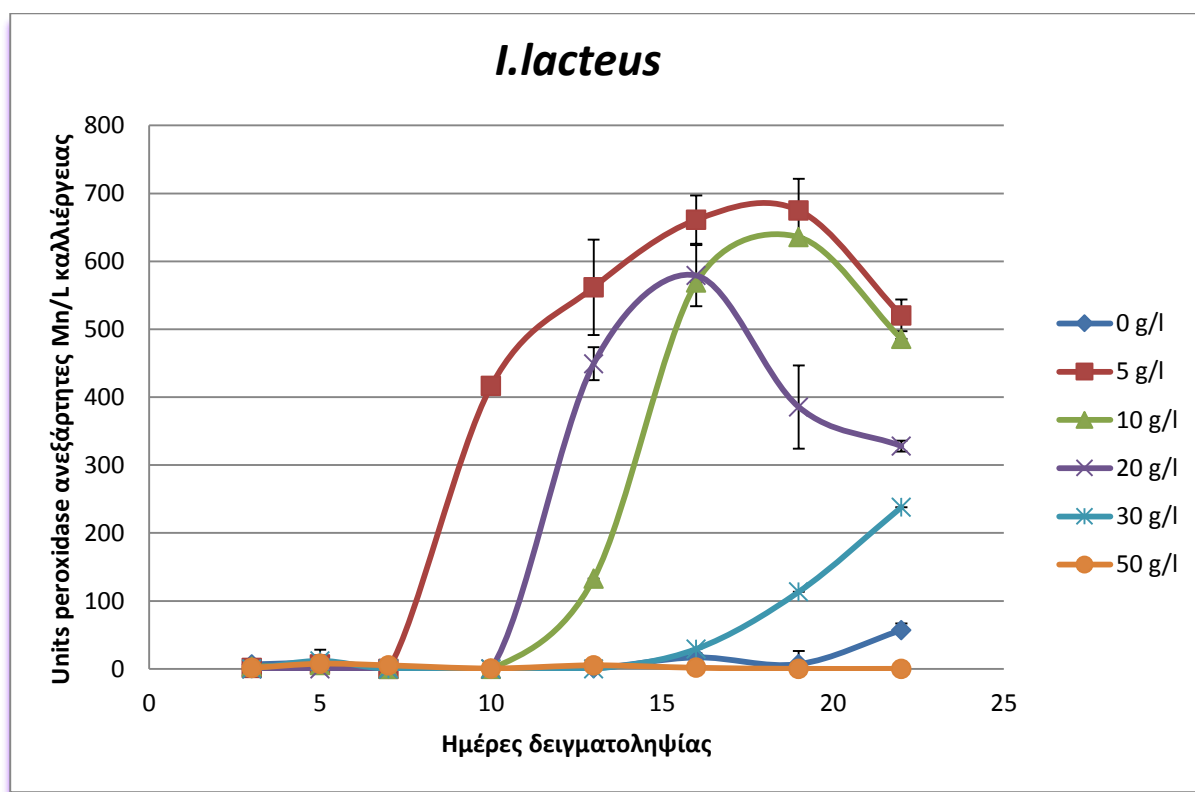
Στην Εικόνα 4.15 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης αζώτου στην ενεργότητα των υπεροξειδασών που εξαρτώνται από το μαγγάνιο.



Εικόνα 4.15: Ενεργότητα υπεροξειδασών που εξαρτώνται από το μαγγάνιο του μύκητα *I.lacteus*

Η μέγιστη ενεργότητα παρατηρείται την 19^η ημέρα για συγκέντρωση αζώτου 5 g/l και είναι **164,402±1,204 Units/L**. Στη συνθήκη 50 g/l δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα του ενζύμου. Σε όλες τις υπόλοιπες συνθήκες η μέγιστη ενεργότητα παρατηρείται την 19^η ημέρα καλλιέργειας.

Στην Εικόνα 4.16 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης αζώτου στην ενεργότητα των υπεροξειδασών που δεν εξαρτώνται από το μαγγάνιο.



Εικόνα 4.16: Ενεργότητα υπεροξειδασών ανεξαρτήτων του μαγγανίου του μύκητα *I.lacteus*

Η μέγιστη ενεργότητα παρατηρείται την 19^η ημέρα για συγκέντρωση αζώτου 5 g/l και είναι **674,180±32,957 Units/L**. Στις συνθήκες 0, 30 και 50 g/l δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα του ενζύμου.

4.4.3. Ενεργότητα υπεροξειδάσης της λιγνίνης

Στον παρακάτω πίνακα 4.5 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές ενεργότητας για την κάθε συνθήκη.

Πίνακας 4.5: Μέγιστες τιμές ενεργότητας υπεροξειδάσης της λιγνίνης

Συγκέντρωση πηγής αζώτου (g/l)	Units/L καλλιέργειας	Ημέρα
0	$2,25 \cdot 10^{-7} \pm 9,43 \cdot 10^{-8}$	3 ^η
5	$7,04 \cdot 10^{-7} \pm 1,29 \cdot 10^{-7}$	5 ^η
10	$1,88 \cdot 10^{-7} \pm 1,14 \cdot 10^{-7}$	3 ^η
20	$1,56 \cdot 10^{-7} \pm 9,88 \cdot 10^{-8}$	5 ^η
30	$7,0 \cdot 10^{-8} \pm 3,80 \cdot 10^{-8}$	7 ^η
50	$8,06 \cdot 10^{-8} \pm 3,80 \cdot 10^{-8}$	5 ^η

4.4.4. Μέτρηση βιομάζας

Στον πίνακα 4.6 παρουσιάζονται οι μετρήσεις της βιομάζας για όλες τις συνθήκες στο τέλος της καλλιέργειας, δηλαδή στην 22^η ημέρα.

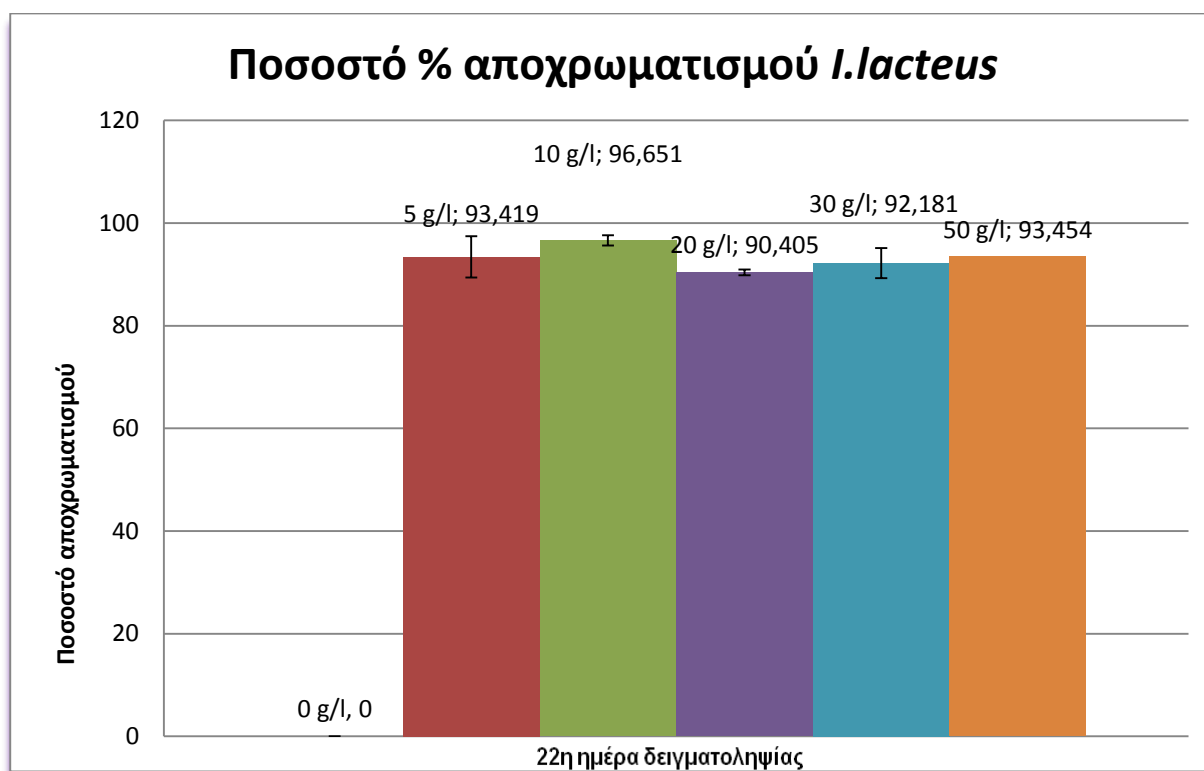
Πίνακας 4.6: Βάρος παραγόμενης βιομάζας

Συγκέντρωση πηγής αζώτου (g/l)	Βιομάζα (mg/ml καλλιέργειας)
0	12,958±1,025
5	12,55±5,867
10	16,60
20	16,010±3,051
30	5,433
50	11,283

Η μέγιστη τιμή παρατηρείται για συγκέντρωση πηγής αζώτου 20 g/l.

4.4.5. Αποχρωματισμός αποβλήτου

Παρακάτω, παρουσιάζεται η ικανότητα του μύκητα στον αποχρωματισμό του αποβλήτου στο τέλος της καλλιέργειας.

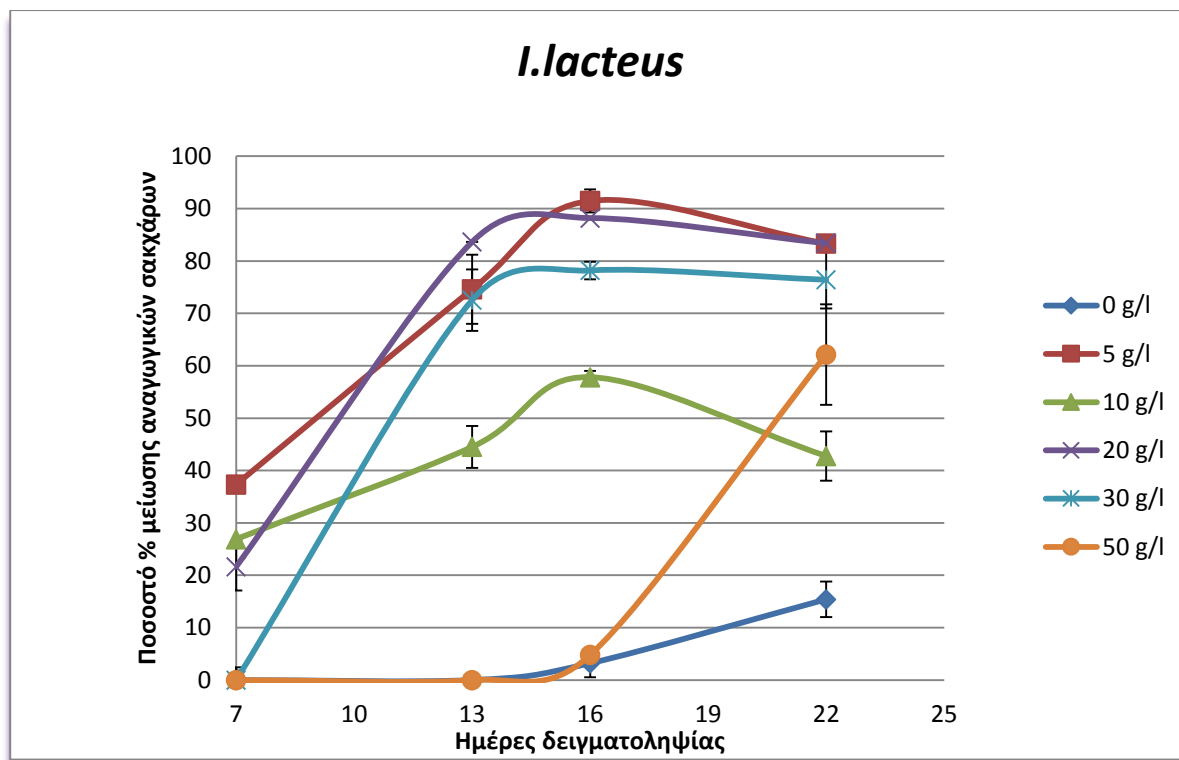


Εικόνα 4.17: Ποσοστό % αποχρωματισμού του αποβλήτου από το μύκητα *I.lacteus*

Το μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού εμφανίζεται για συγκέντρωση πηγής αζώτου 10 g/l με ποσοστό **96,651%**. Για μηδενική συγκέντρωση δεν παρατηρήθηκε αποχρωματισμός του αποβλήτου. Για όλες τις υπόλοιπες συνθήκες τα αποτελέσματα είναι εξίσου ικανοποιητικά.

4.4.6. Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων

Παρακάτω, παρουσιάζεται η ικανότητα του μύκητα στην κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων κατά την 7, 13, 16 και 22^η ημέρα καλλιέργειας.

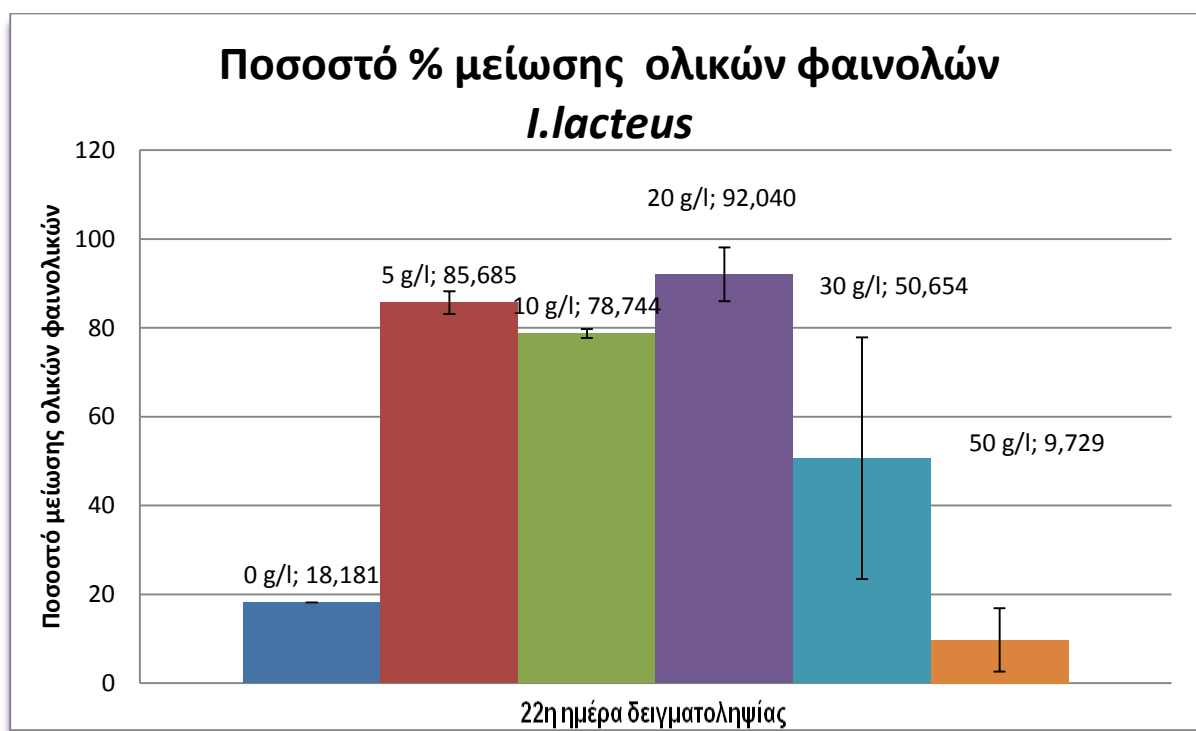


Εικόνα 4.18: Ποσοστό % κατανάλωσης αναγωγικών σακχάρων από το μύκητα *I.lacteus*

Στη παραπάνω εικόνα παρατηρείται ότι μέχρι και την 7^η ημέρα για όλες τις συνθήκες δεν υπήρξε κατανάλωση σακχάρων από τον μύκητα. Την 16^η ημέρα καλλιέργειας για συγκέντρωση αζώτου 5 g/l ο μύκητας εμφανίζει τη μέγιστη κατανάλωση σακχάρων που είναι $91,463 \pm 2,184$ %. Επίσης, οι συνθήκες 20 και 30 g/l εμφανίζουν υψηλό ποσοστό κατανάλωσης για την ίδια ημέρα δειγματοληψίας.

4.4.7. Ικανότητα μείωσης ολικών φαινολικών

Στην Εικόνα 4.19 παρουσιάζεται η ικανότητα του μύκητα στη μείωση των φαινολικών ενώσεων στο τέλος της καλλιέργειας.



Εικόνα 4.19: Ποσοστό % κατανάλωσης ολικών φαινολικών από το μύκητα *I. lacteus*

Η βέλτιστη ικανότητα στην αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων εμφανίζεται στη συγκέντρωση πηγής αζώτου 20 g/l με ποσοστό **92,010±4,298 %** μείωσης φαινολικών ενώσεων. Για τις συνθήκες των 5 και 10 g/l τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά.

4.4.8. Μείωση φαινολών βιομάζας

Στον πίνακα 4.7 παρουσιάζονται οι μετρήσεις των ολικών φαινολών της βιομάζας για συγκέντρωση πηγής αζώτου 30 g/l την 22^η ημέρα καλλιέργειας.

Πίνακας 4.7: Βάρος φαινολών στη βιομάζα

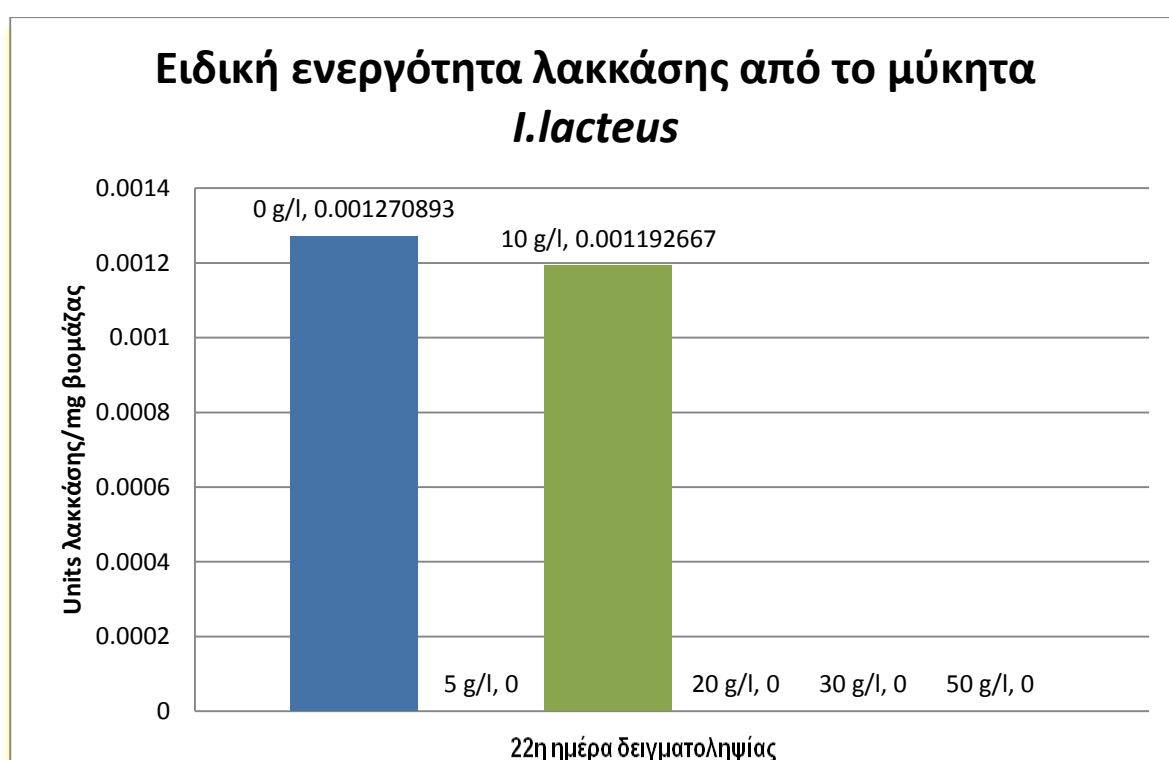
Συγκέντρωση πηγής αζώτου (g/l)	mg φαινολών/g βιομάζας	
	Ενδοκυτταρικά	Εξωκυτταρικά
20	2,065±0,283	131,522±30,933

4.4.9. Μέτρηση λιπασών

Για τον υπολογισμό της ενζυμικής ενεργότητας των λιπασών, εξετάστηκαν όλες οι συνθήκες την 3, 10, 16 και 22^η ημέρα της καλλιέργειας. Για συγκέντρωση πηγής αζώτου 20 g/l την 3^η ημέρα μετρήθηκε η μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας των λιπασών η οποία είναι **7,35±0,58 Units/l** στην καλλιέργεια. Για τα υπόλοιπα δείγματα και για όλες τις συνθήκες η ενεργότητα του ενζύμου ήταν πολύ χαμηλή.

4.4.10. Ειδική ενεργότητα

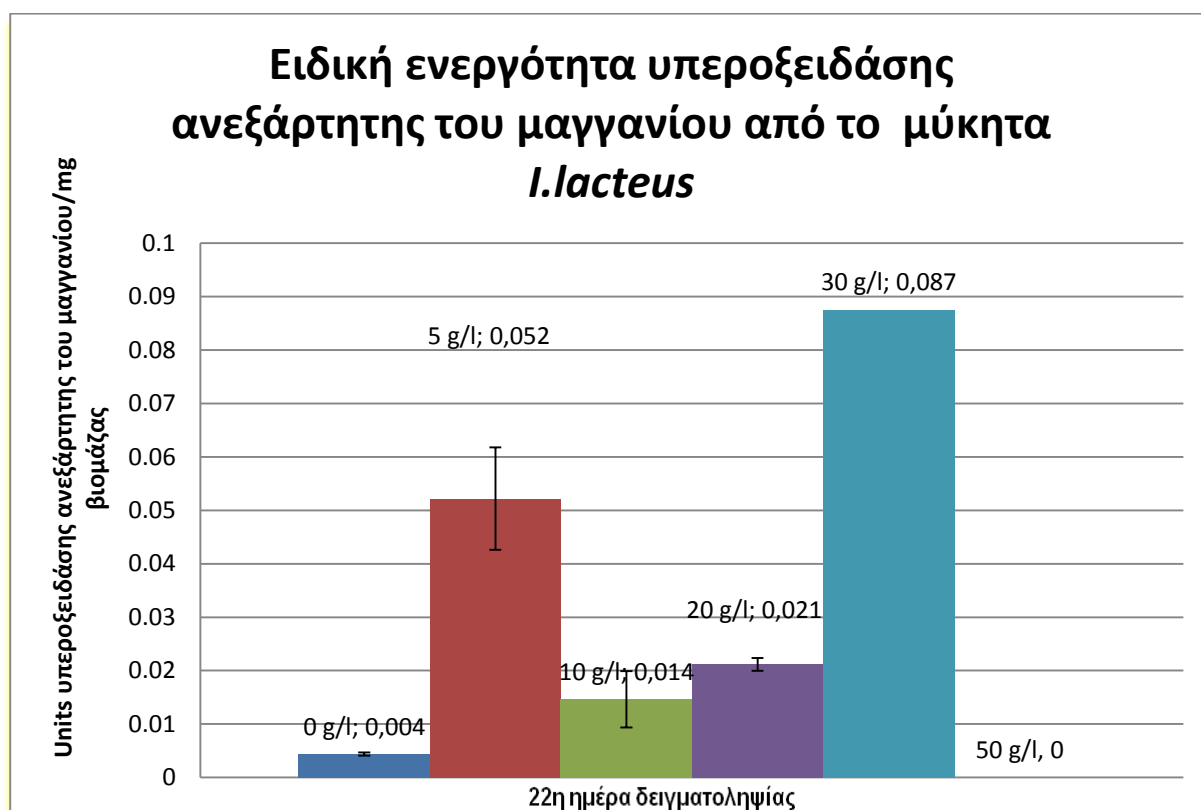
Στην παρακάτω Εικόνα 4.20 παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα για τη λακκάση κατά το τέλος της καλλιέργειας.



Εικόνα 4.20: Ειδική ενεργότητα λακκάσης από το μύκητα *I.lacteus* την 22^η ημέρα καλλιέργειας

Από την παρακάτω εικόνα προκύπτει το συμπέρασμα ότι, απουσία αζώτου, το ένζυμο παράγεται εντονότερα σε σχέση με τις άλλες συνθήκες. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.14, οι τιμές της ενεργότητας της λακκάσης ήταν χαμηλές σε σχέση και με τις αντίστοιχες από το *P.citrinopileatus*. Για αυτό το λόγο οι τιμές της ειδικής ενεργότητας είναι κοντά στο μηδέν για όλες τις συνθήκες.

Στην Εικόνα 4.21 παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα της υπεροξειδάσης που δεν εξαρτάται από το μαγγάνιο την 22^η ημέρα καλλιέργειας.

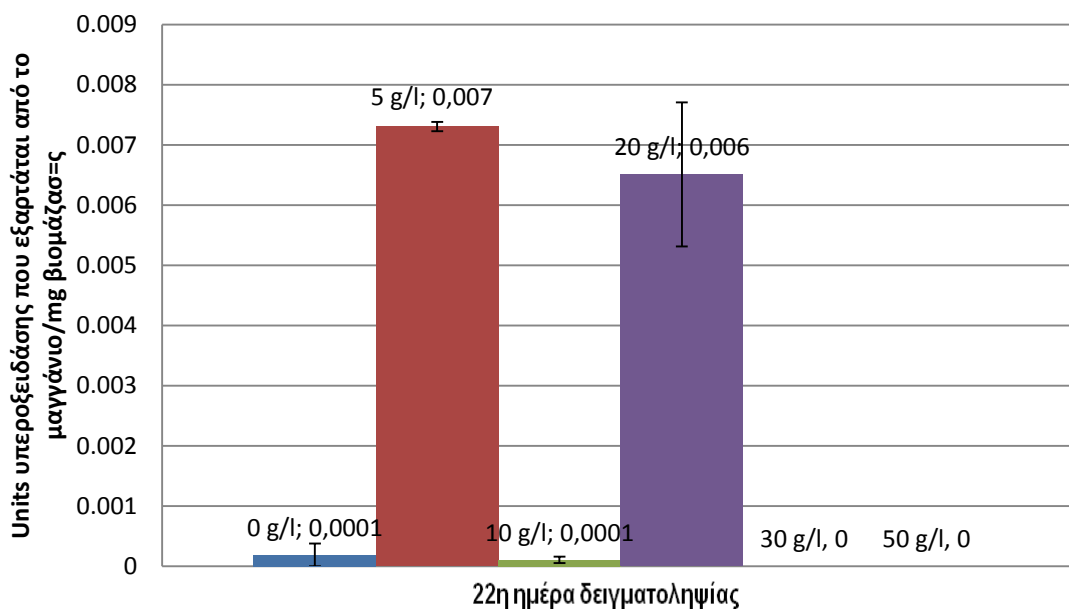


Εικόνα 4.21: Ειδική ενεργότητα υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του μαγγανίου από το μύκητα *I.lacteus* την 22^η ημέρα καλλιέργειας

Μεγαλύτερη τιμή ειδικής ενεργότητας εμφανίζεται για συγκέντρωση πηγής αζώτου 30 g/l και είναι **0,087 Units /mg βιομάζας**.

Στην Εικόνα 4.22 παρουσιάζεται η ειδική ενεργότητα της υπεροξειδάσης που δεν εξαρτάται από το μαγγάνιο την 22^η ημέρα καλλιέργειας.

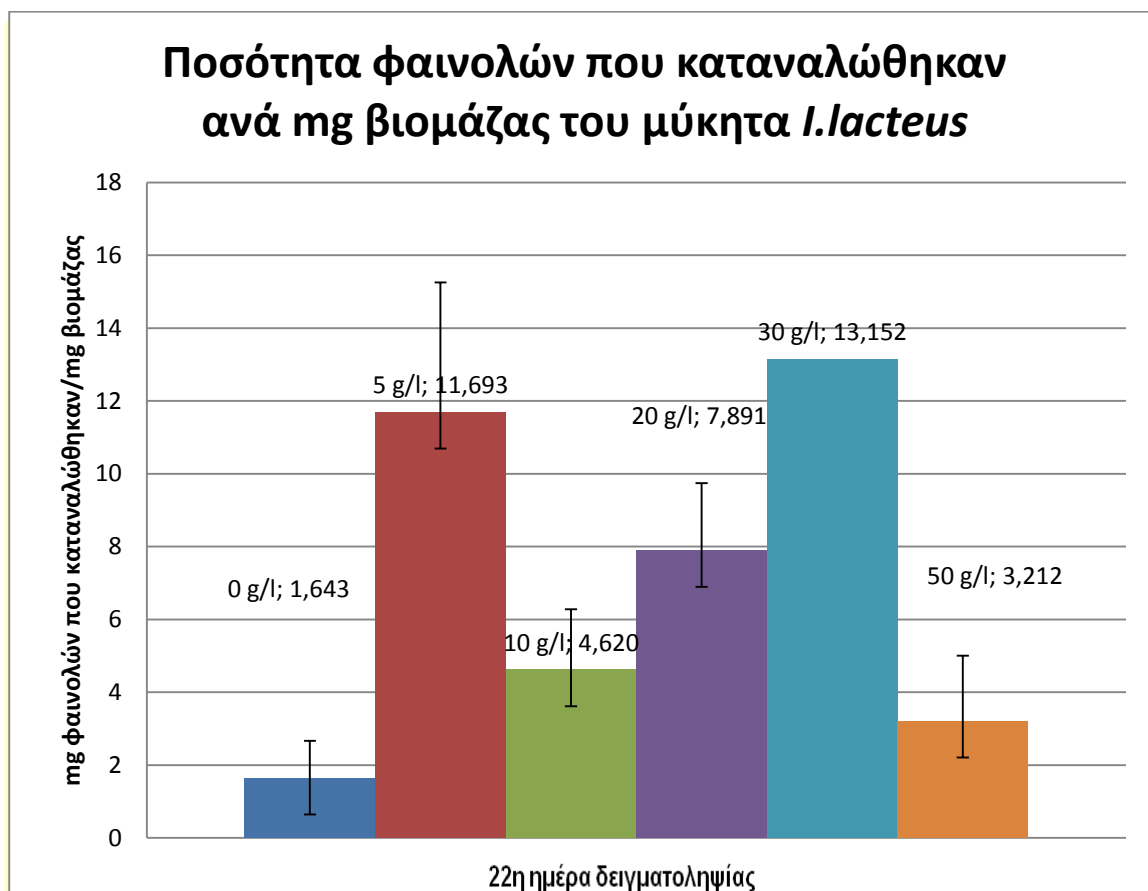
Ειδική ενεργότητα υπεροξειδάσης που εξαρτάται από το μαγγάνιο του μύκητα *I.lacteus*



Εικόνα 4.22: Ειδική ενεργότητα υπεροξειδάσης που εξαρτάται από το μαγγάνιο από το μύκητα *I.lacteus* την 22^η ημέρα καλλιέργειας

Μεγαλύτερη τιμή ειδικής ενεργότητας εμφανίζεται για συγκέντρωση πηγής αζώτου 5 g/l και είναι **0,007 Units /mg βιομάζας**. Η τιμή αυτή είναι εξίσου κοντά με αυτή που εμφανίζεται για συγκέντρωση 20 g/l.

Στην Εικόνα 4.23 παρουσιάζεται η καταναλωθείσα ποσότητα φαινολών ανά ποσότητα βιομάζας την 22^η ημέρα καλλιέργειας.



Εικόνα 4.23: Καταναλωθείσα ποσότητα φαινολών του μύκητα *I.lacteus* την 22^η ημέρα καλλιέργειας

Στην συνθήκη 30 g/l φαίνεται να υπάρχει εντονότερη έκφραση του ενζύμου. Εξίσου υψηλή είναι και για συγκέντρωση πηγής αζώτου 5 g/l.

4.5 ΠΕΙΡΑΜΑ 5: ΖΥΜΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

4.5.1. Ζυμογράφημα λακκάσης του μύκητα *P.citrinopileatus*

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκε το ένζυμο λακκάση από το υπερκείμενο της καλλιέργειας του μύκητα *P.citrinopileatus* σε απόβλητο, με χρήση υποστρώματος ABTS.



Εικόνα 4.24: Ζυμογράφημα λακκάσης από το μύκητα *P.citrinopileatus*

Οι πρωτεΐνες με αυτή τη μέθοδο διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι πιο ελαφριές έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα οπότε απομακρύνονται περισσότερο από τη θέση φόρτωσης. Αντίστοιχα, οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους απομακρύνονται λιγότερο. Με βάση την Εικόνα 3.5 το μοριακό βάρος της λακκάσης φαίνεται να είναι περίπου 60 kDa.

4.5.2. Ζυμογράφημα υπεροξειδάσης που εξαρτάται από το μαγγάνιο του μύκητα *P.citrinopileatus*

Στην παρακάτω εικόνα 4.25 παρουσιάζεται το ζυμογράφημα της υπεροξειδάσης που εξαρτάται από το μαγγάνιο του μύκητα *P.citrinopileatus*.



Εικόνα 4.25: Ζυμογράφημα υπεροξειδάσης του μαγγανίου του μύκητα *P.citrinopileatus*

Με βάση την Εικόνα 3.5 το μοριακό βάρος της υπεροξειδάσης του μαγγανίου υπολογίζεται περίπου στα 55 kDa.

4.5.3. Ζυμογράφημα υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του μαγγανίου του μύκητα *P.citrinopileatus*

Στην εικόνα 4.26 παρουσιάζεται η υπεροξειδάση που δεν εξαρτάται από το μαγγάνιο του μύκητα *P.citrinopileatus*.



Εικόνα 4.26: Ζυμογράφημα υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του μαγγανίου του μύκητα *P.citrinopileatus*

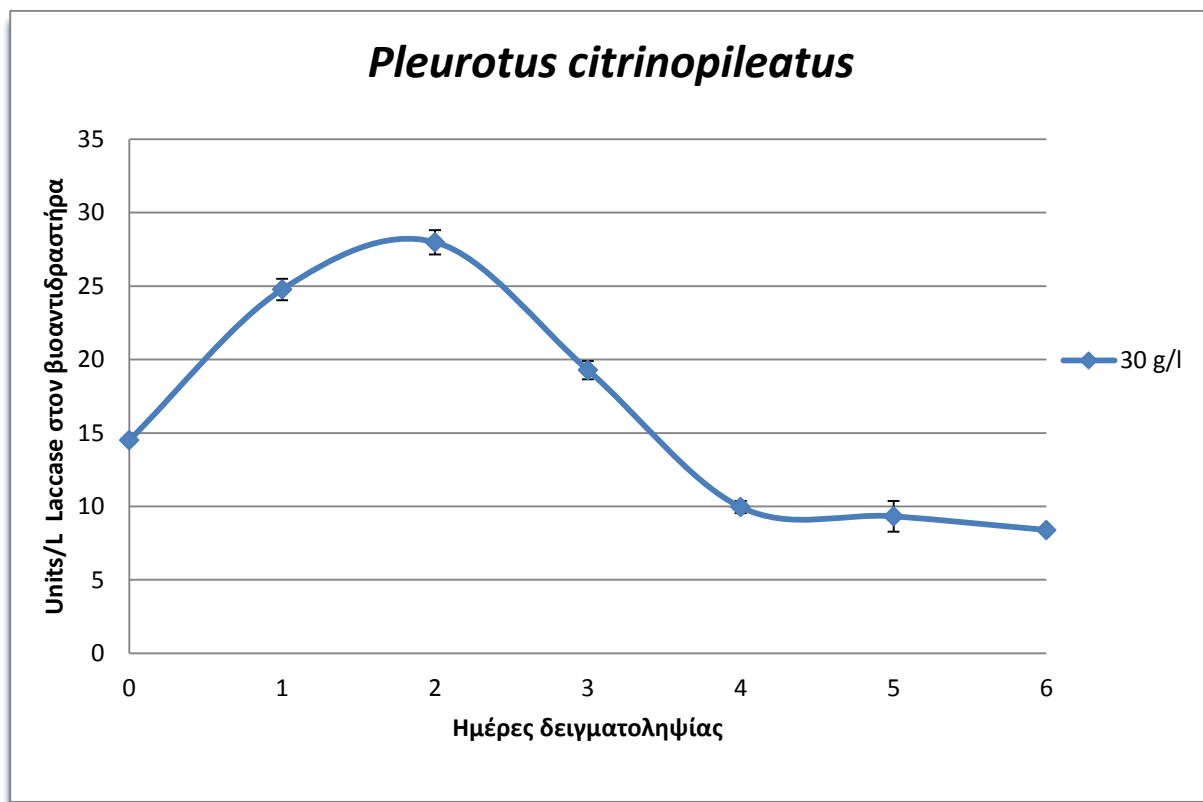
Με βάση την Εικόνα 3.5 το μοριακό βάρος της υπεροξειδάσης που δεν εξαρτάται από το μαγγάνιο φαίνεται να είναι περίπου 55 kDa.

Από τις Εικόνες 4.25 και 4.26 φαίνεται ότι τα ένζυμα με τις ενεργότητες αυτές εμφανίζονται στο ίδιο μοριακό βάρος, κάτι που υποδεικνύει ότι στο εξεταζόμενο δείγμα πιθανώς εμφανίζονται μόνο υπεροξειδάσες ανεξάρτητες του μαγγανίου.

4.6 ΠΕΙΡΑΜΑ 6: ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ ΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ

4.6.1. Ενεργότητα λακκάσης

Στην Εικόνα 4.27 παρουσιάζεται η ενεργότητα της λακκάσης ανά ημέρα δειγματοληψίας. Ως δείγμα 0 λαμβάνεται το δείγμα τη στιγμή του εμβολιασμού του βιοαντιδραστήρα. Η συγκέντρωση της πηγής αζώτου είναι 30 g/l.

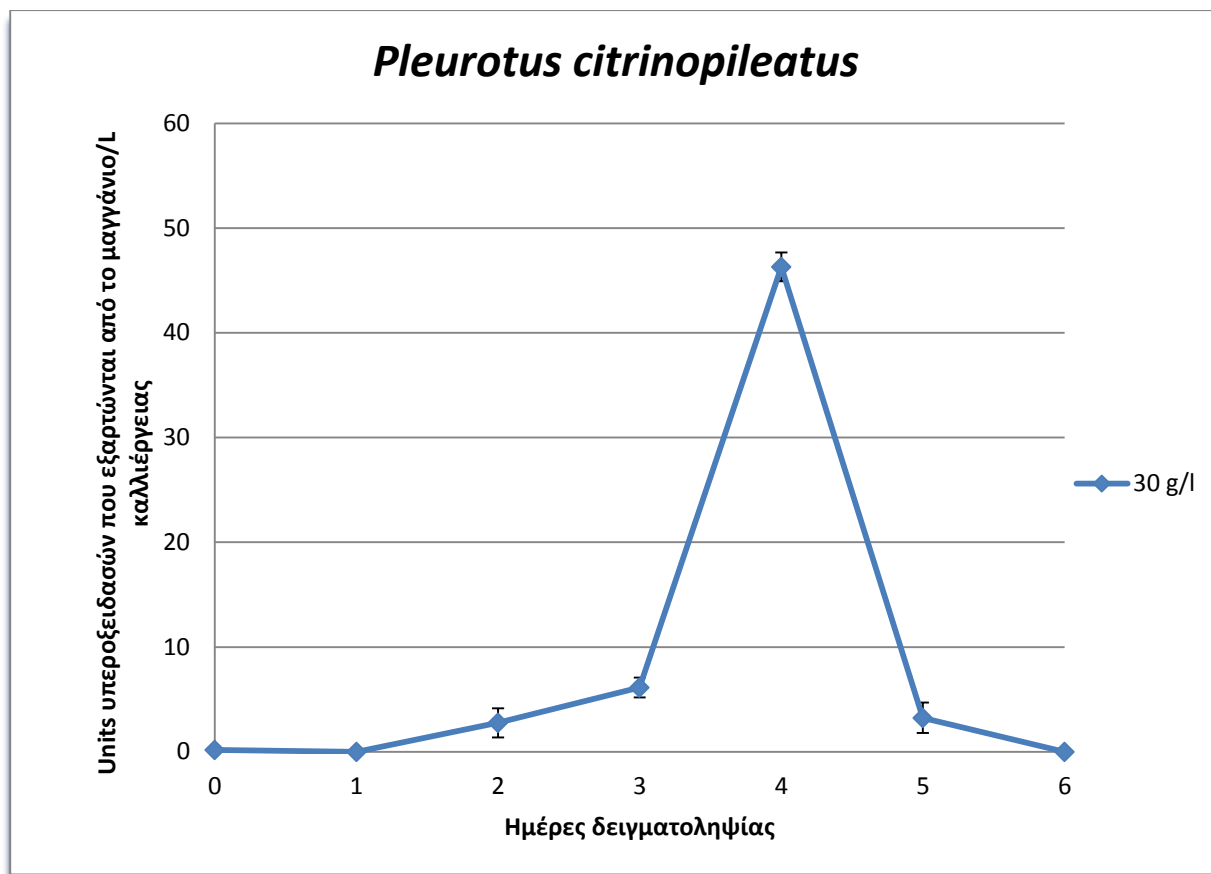


Εικόνα 4.27: Ενεργότητα λακκάσης του μύκητα *P.citrinopileatus*

Η μέγιστη ενεργότητα παρατηρείται την 2^η ημέρα και είναι **27,985±0,831 Units/L**. Στην συνέχεια η ενεργότητα μειώνεται και παραμένει περίπου σταθερή από την 5^η ημέρα και μετά.

4.6.2. Ενεργότητα υπεροξειδασών εξαρτημένων και ανεξάρτητων μαγγάνιου

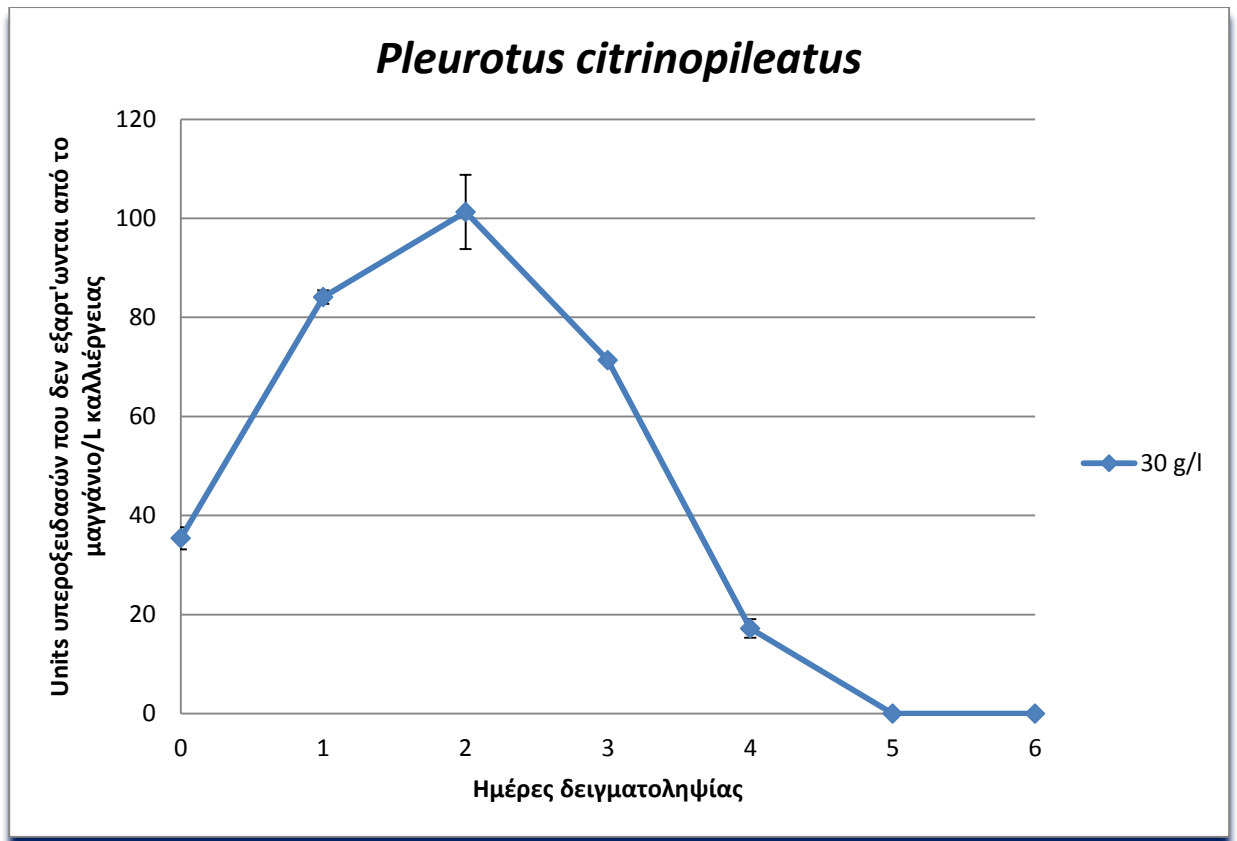
Στην Εικόνα 4.28 παρουσιάζεται η ενεργότητα των υπεροξειδασών που εξαρτώνται από το μαγγάνιο.



Εικόνα 4.28: Ενεργότητα υπεροξειδασών που εξαρτώνται από το μαγγάνιο του μύκητα *P.citrinopileatus*

Η μέγιστη ενεργότητα παρατηρείται την 4^η ημέρα και είναι **44,946±1,366 Units/L**. Οι υπεροξειδάσες αρχίζουν να παράγονται την 2^η ημέρα ενώ την 5^η ημέρα μειώνονται σημαντικά και τελικά μηδενίζεται η ενεργότητα τους την τελευταία ημέρα δειγματοληψίας.

Στην Εικόνα 4.29 παρουσιάζεται η ενεργότητα των υπεροξειδασών που δεν εξαρτώνται από το μαγγάνιο.



Εικόνα 4.29: Ενεργότητα υπεροξειδασών ανεξαρτήτων του μαγγανίου του μύκητα *P.citrinopileatus*

Η μέγιστη ενεργότητα παρατηρείται την 2^η ημέρα και είναι **101,300±7,513 Units/L**. Έπειτα, η ενεργότητα μειώνεται και τελικά μηδενίζεται την 6^η ημέρα δειγματοληψίας.

4.6.3. Μέτρηση βιομάζας

Στον πίνακα 4.8 παρουσιάζονται οι μετρήσεις της βιομάζας ανά ημέρα δειγματοληψίας.

Πίνακας 4.8: Βάρος παραγόμενης βιομάζας

Ημέρα δειγματοληψίας	Όγκος δείγματος (ml)	Βιομάζα (mg/ml καλλιέργειας)
0	5	149
1	5	51,8
2	5	60
3	5	63,6
4	7	36,3
5	7	34,4
6	6	23,3

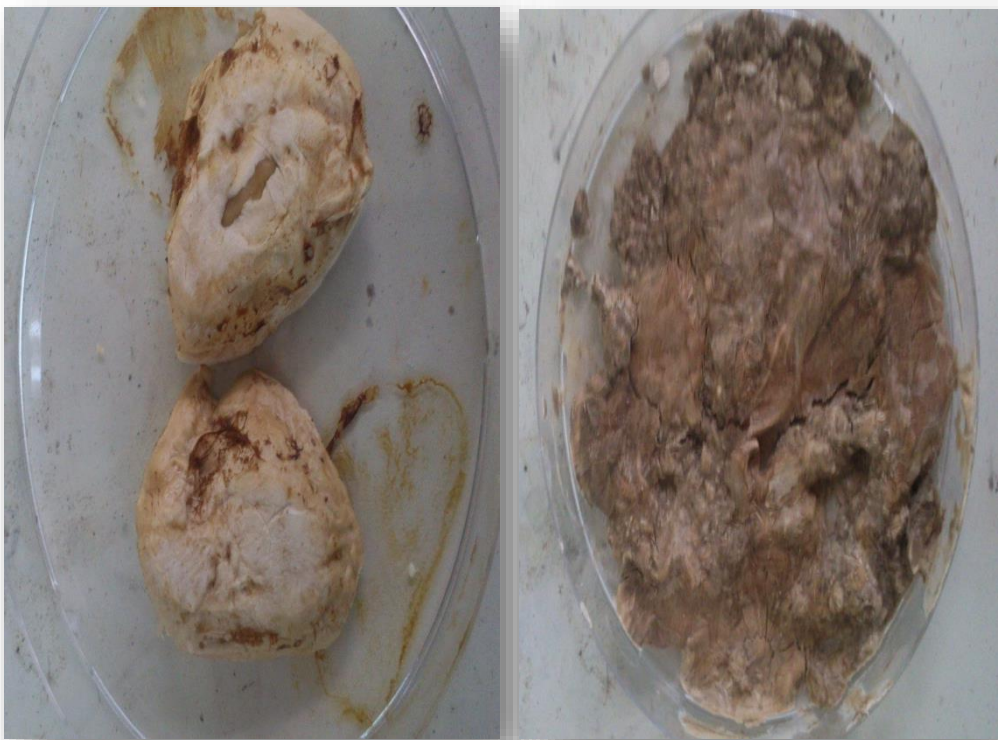
Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο δείγμα την στιγμή του εμβολιασμού. Αυτό σημαίνει ότι το βάρος που μετρήθηκε οφείλεται στο απόβλητο που παρέμεινε κατά την φυγοκέντρηση και όχι σε παραγόμενη βιομάζα.

Στον πίνακα 4.9 παρουσιάζονται η ποσότητα του εμβολίου που προστέθηκε στο βιοαντιδραστήρα και η ολική βιομάζα που παράχθηκε.

Πίνακας 4.9: Βάρος εμβολίου και ολικής βιομάζας

Βάρος εμβολίου <i>P.citrinopileatus</i> (mg)	Ολική βιομάζα (mg)
4235	7101

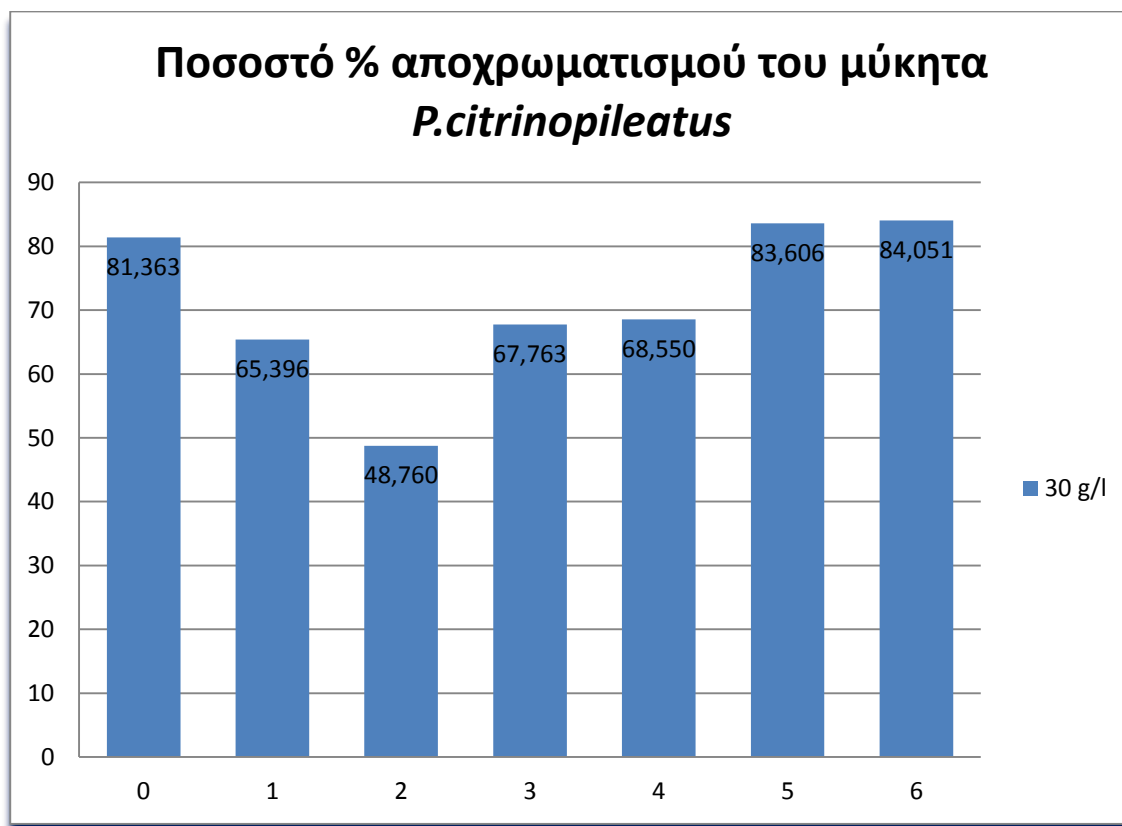
Παρατηρήθηκε αύξηση την βιομάζας περίπου 68%.



Εικόνα 4.30: Αριστερά: Μύκητας *P.citrinopileatus* που εμβολιάστηκε στο βιοαντιδραστήρα, Δεξιά: Βιομάζα που παράχθηκε από το βιοαντιδραστήρα

4.6.4. Αποχρωματισμός αποβλήτου

Παρακάτω, παρουσιάζεται η ικανότητα του μύκητα στον αποχρωματισμό του αποβλήτου στο τέλος της καλλιέργειας.



Εικόνα 4.31: Ποσοστό % αποχρωματισμού του αποβλήτου από το μύκητα *P.citrinopileatus* ανά ημέρα δειγματοληψίας

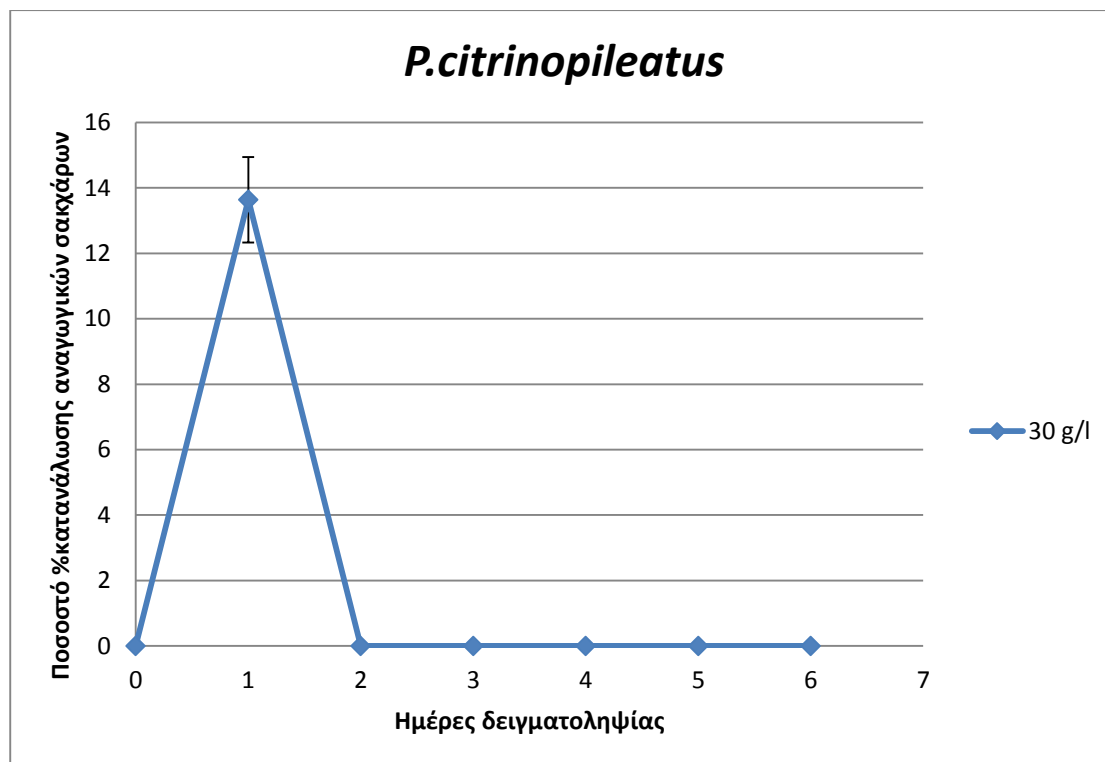
Το μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού εμφανίζεται την 6^η ημέρα της καλλιέργειας και είναι **84,051%**.



Εικόνα 4.32: Αριστερά: Βιοαντιδραστήρας την 1^η ημέρα παραμονής, Δεξιά: Βιοαντιδραστήρας την 6^η ημέρα παραμονής

4.6.5. Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων

Παρακάτω, παρουσιάζεται η ικανότητα του μύκητα στην κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων ανά ημέρα δειγματοληψίας.

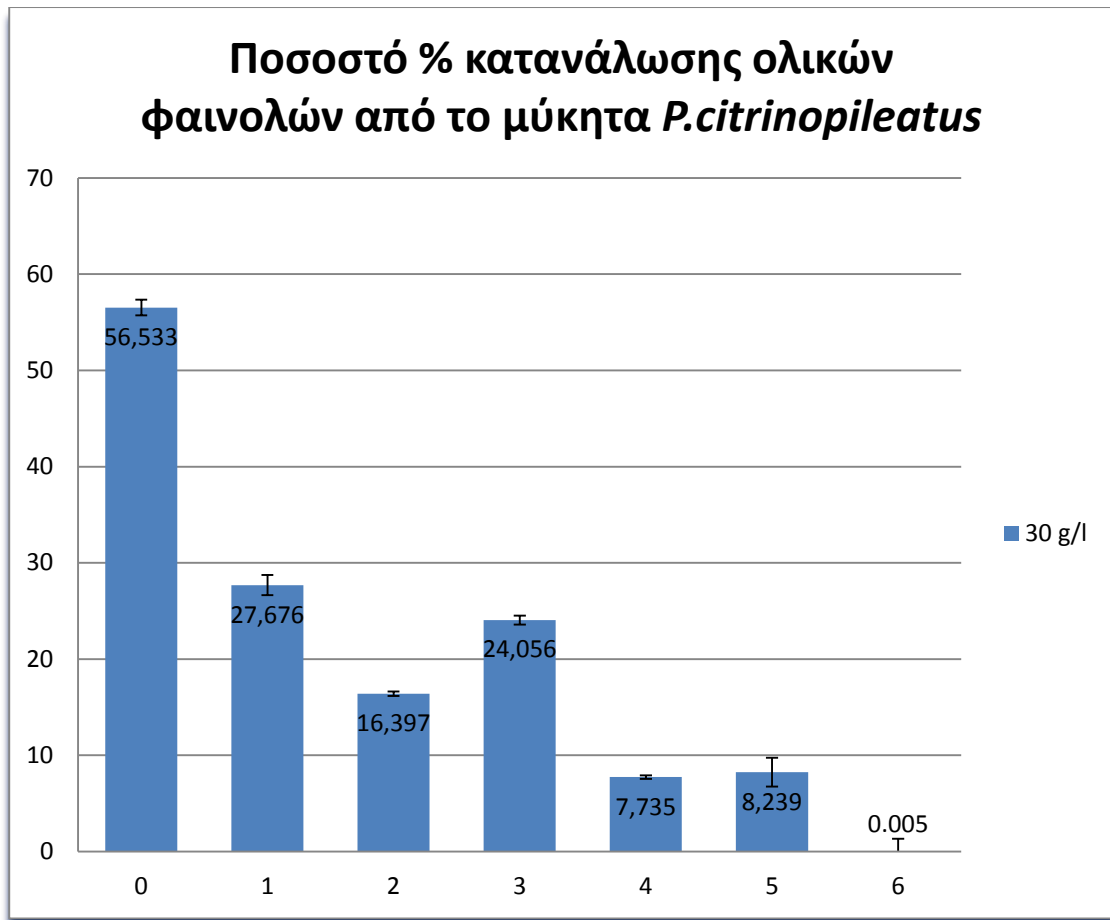


Εικόνα 4.33: Ποσοστό % κατανάλωσης αναγωγικών σακχάρων από το μύκητα *P.citrinopileatus*

Την 1^η ημέρα καλλιέργειας ο μύκητας εμφανίζει τη μέγιστη κατανάλωση σακχάρων και είναι **13,636±1,302%**. Στην συνέχεια, το ποσοστό κατανάλωσης μηδενίζεται.

4.6.6. Ικανότητα μείωσης ολικών φαινολικών

Στην Εικόνα 4.36 παρουσιάζεται η ικανότητα του μύκητα στη μείωση των φαινολικών ενώσεων ανά ημέρα δειγματοληψίας.



Εικόνα 4.34: Ποσοστό % κατανάλωσης ολικών φαινολικών από το μύκητα *P.citrinopileatus* ανά ημέρα δειγματοληψίας

Τα αποτελέσματα από την παραπάνω εικόνα δεν είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά διότι δεν παρατηρείται υψηλό ποσοστό κατανάλωσης των ολικών φαινολών. Για το δείγμα 0 (τη στιγμή του εμβολιασμού) το ποσοστό είναι κοντά στο 57% αλλά αυτό οφείλεται στη χαμηλή τιμή απορρόφησης και στη μεγάλη διαφορά με την αντίστοιχη τιμή του τυφλού δείγματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η βιολογική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η βιολογική μέθοδος επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου με τη χρήση Βασιδιομυκήτων με στόχο την αποτοξικοποίησή τους. Τα στελέχη μυκήτων λευκής σήψης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το *Pleurotus citrinopileatus* και το *Irpex lacteus*. Από τα δύο εξεταζόμενα αυτά στελέχη επετεύχθη ποσοστό αποχρωματισμού του αποβλήτου μέχρι και 96%, ενώ η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο απόβλητο μειώθηκε κατά 92%. Τέλος, σημειώνεται 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* επιτυγχάνει αντίστοιχα αποτελέσματα μέσω παραγωγής υπεροξειδασών. Ακολουθεί συζήτηση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος ξεχωριστά.

5.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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 1342 U/l όταν αυτό καλλιεργήθηκε σε pH 6 και σε συγκέντρωση αζώτου 30 g/l . Αντίθετα, το στέλεχος *I. lacteus* παρήγαγε λακκάση με μέγιστη ενεργότητα 57 U/l όταν καλλιεργήθηκε σε pH 6 και συγκέντρωση αζώτου 5g/l, 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 μόλις 107-118 U/l για στελέχη του γένους *Pleurotus*. Επίσης, σε μελέτη που αφορούσε το *I.lacteus* είχε επιτευχθεί ενεργότητα λακκάσης μόλις 17 U/l την 31^η ημέρα καλλιέργειας [Aggelis et al., 2002].

Όσον αφορά στον προσδιορισμό της ενεργότητας των υπεροξειδασών, το στέλεχος *P. citrinopileatus* παρουσίασε μέγιστη ενεργότητα υπεροξειδάσης εξαρτημένης και ανεξάρτητης του μαγγανίου 346 U/l και 860 U/l για συγκεντρώσεις πηγής αζώτου 10 και 30 g/l αντίστοιχα. Το στέλεχος *I. lacteus* εμφάνισε μέγιστη ενεργότητα υπεροξειδάσης εξαρτημένης και ανεξάρτητης του μαγγανίου 164 U/l και 674 U/l αντίστοιχα με προσθήκη 5 g/l τρυγικού διαμμωνίου. Σε αντίστοιχες μελέτες για το *Pleurotus stipticus* οι μέγιστες ενεργότητες υπεροξειδάσης εξαρτημένης και ανεξάρτητης του μαγγανίου 0,1 U/l και 12,5 U/l , για το στέλεχος *Pleurotus ostreatus* ήταν 19,1 U/l και 16 U/l ενώ για το *Irpex lacteus* 0,3 U/l και 6,0 U/l αντίστοιχα. Τα

αποτελέσματα είναι πολύ μικρότερα καθιστώντας τα μη συγκρίσιμα με τα παραπάνω [Aggelis et al., 2002].

Κάθε μύκητας λευκής σήψης εκφράζει διαφορετικό συνδυασμό λιγνινολυτικών ενζύμων [Hattaka., 1994]. Το γεγονός αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, καθώς σε κανένα από τα δύο στελέχη δεν ανιχνεύθηκε παρόμοια ενεργότητα και των τριών ενζύμων. Συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα που παρατίθενται παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η λιγνινολυτική δραστηριότητα του στελέχους *P. citrinopileatus* οφείλεται κυρίως σε λιγνινολυτικά ένζυμα με ενεργότητα λακκάσης. Αντίθετα, στο στέλεχος *I. lacteus* εκφράζονται κυρίως υπεροξειδάσες.

Οι λιπάσες είναι ένζυμα τα οποία παράγονται από λιπολυτικούς οργανισμούς. Οι λιπολυτικοί αυτοί οργανισμοί καταναλώνουν υπολείμματα ελαίου τα οποία περιέχονται στα ΥΑΕ και τα καθιστούν ιδανικά υποστρώματα για την ανάπτυξή τους. Λόγω του μεγάλου εύρους εφαρμογών των λιπασών, έχουν γίνει μελέτες για τη δυνατότητα παραγωγής αυτού του ενζύμου από ΥΑΕ [Brozzoli et al., 2009]. Ιδιαίτερα καλή αποδοτικότητα στην παραγωγή λιπάσης έχουν παρουσιάσει διάφοροι μικροοργανισμοί, μεταξύ των οποίων οι *Candida cylindracea*, *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium citrinum* και άλλοι μύκητες [Abrunhosa et al., 2013]. Στην παρούσα εργασία, προσδιορίστηκε η ικανότητα των μικροοργανισμών να εκφράσουν το ένζυμο λιπάση. Το στέλεχος *P. citrinopileatus* παρήγαγε το ένζυμο αυτό και η ενεργότητα που μετρήθηκε ήταν 3,88 U/l. Η αντίστοιχη ενεργότητα για το *I. lacteus* ήταν 7,35 U/l.

Όσον αφορά στον αποχρωματισμό του αποβλήτου, στην καλλιέργεια του στελέχους *P. citrinopileatus* επιτεύχθηκε 86% αποχρωματισμός για συγκέντρωση πηγής αζώτου 30 g/l. Αντίστοιχα, το στέλεχος *I. lacteus* αποχρωμάτισε το απόβλητο κατά 96% σε συγκέντρωση πηγής αζώτου 10 g/l. Από άλλους ερευνητές έχει επιτευχθεί αποχρωματισμός του αποβλήτου 41-44% (Ntougias et al., 2012), 49% (Aggelis et al., 2002), 48% και 39% (Koutrotsios et al., 2014) για τα στελέχη του γένους *Pleurotus* και 56% για το *I. lacteus* (Koutrotsios et al., 2014).

Ο κύριος στόχος στην επεξεργασία του κασίγαρου είναι η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι το φαινολικό φορτίο του αποβλήτου μειώθηκε κατά 90% και 92% για το στέλεχος *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* αντίστοιχα. Γενικά, παρατηρήθηκε ότι ο μύκητας *P. citrinopileatus* επιτυγχάνει μείωση των φαινολικών ενώσεων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 35% σε όλες τις συνθήκες καλλιέργειας, δηλαδή για συγκέντρωση πηγής αζώτου από 0-50 g/l. 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*. Σε πρόσφατη έρευνα για το *I. lacteus* έχει επιτευχθεί μείωση φαινολικών έως και 59%, ενώ για τα στελέχη *Pleurotus djamor* και *P. pulmonarius* 76% και 12% αντίστοιχα [Koutrotsios et al., 2014].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα στελέχη *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* εμφανίζουν και τις τρεις βασικές λιγνινολυτικές ενεργότητες, σε διαφορετικές όμως αναλογίες. 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.

Τέλος, η παραχθείσα βιομάζα από την καλλιέργεια των στελεχών *P. citrinopileatus* φτάνει τα 35 mg/ml καλλιέργειας για συγκέντρωση πηγής αζώτου 50 g/l ενώ για το και *I. lacteus* φτάνει τα 16,6 mg/ml καλλιέργειας για συγκέντρωση πηγής αζώτου 20 g/l. Για το *I. lacteus*, στη συνθήκη που προέκυψε η μέγιστη βιομάζα παρατηρήθηκε και η υψηλότερη αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου.

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 75% για το στέλεχος *P. citrinopileatus* με προσθήκη εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού και το 91% για το στέλεχος *I. lacteus* με προσθήκη τρυγικού διαμμωνίου.

Όσον αφορά τα ζυμογραφήματα, παρατηρήθηκε ότι οι ζώνες που εμφανίζουν ενεργότητα υπεροξειδασών αντιστοιχούν στις ίδιες πρωτεϊνικές ζώνες. Αυτό υποδηλώνει ότι οι δύο αυτές ζώνες εκφράζουν παρόμοια ισoenζυμα που έχουν ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένες υπεροξειδάσες μπορεί να συνδέονται με περισσότερες από μία δραστικότητες, όπως για παράδειγμα εμφανίζοντας ταυτόχρονα ενεργότητα υπεροξειδάσες εξαρτημένες και ανεξάρτητες του μαγγανίου (Shrivastava et al., 2005; Gregori et al., 2008).

Μελετήθηκε επίσης η ικανότητα αποχρωματισμού και κατανάλωσης φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου σε βιοαντιδραστήρα με τη χρήση του μύκητα *P. citrinopileatus*. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το μέγιστο ποσοστό αποχρωματισμού εμφανίζεται την 6^η ημέρα παραμονής και είναι 84%, ενώ το μέγιστο ποσοστό κατανάλωσης των φαινολικών είναι 28% την 2^η ημέρα. Σε αντίστοιχη μελέτη (Blanquez et al., 2002) το ποσοστό αποχρωματισμού για 14 ημέρες παραμονής στο βιοαντιδραστήρα και χρήση του μύκητα *P. flavido-alba* είναι 70,3% και για τα φαινολικά 51,7%. Επομένως, τα αποτελέσματα είναι αρκετά ενθαρρυντικά όσον αφορά στην ικανότητα του μύκητα στο αποχρωματισμό αλλά όχι τόσο στην ικανότητα κατανάλωσης των φαινολικών ενώσεων.

5.3 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι οι Βασιδιομύκητες *P. citrinopileatus* και *I. lacteus* είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε υγρό απόβλητο ελαιουργείου σε συγκέντρωση 25% v/v. Από έρευνες έχει προταθεί (Aggelis et al., 2003), η περαιτέρω μελέτη των παραγόντων που επιδρούν στην ανάπτυξη των Βασιδιομυκήτων σε ΥΑΕ όπως της συγκέντρωσης του υποστρώματος, αλλά και η έρευνα για ανάπτυξη τους σε μη αποστειρωμένο υπόστρωμα. Για το *I.lacteus* τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά διότι η μείωση των ολικών φαινολών φτάνει το 92%, ενώ ο αποχρωματισμός του αποβλήτου το 96%. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για το *P.citrinopileatus* είναι 90% και 86% τα οποία είναι εξίσου υψηλά. Η αποτελεσματικότητα των μυκήτων λευκής σήψης στην αποδόμηση των ΥΑΕ οφείλεται στην ικανότητα τους να παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα ικανά να διασπάσουν φαινολικές ενώσεις, ταννίνες καθώς και άλλες ενώσεις παρεμφερών δομών. Οι Βασιδιομύκητες που μελετήθηκαν παρήγαγαν λιγνινολυτικά ένζυμα κατά την αποικοδόμηση του υγρού αποβλήτου ελαιουργείου. Η λιγνινολυτική δραστηριότητα του στελέχους *P. citrinopileatus* φαίνεται να οφείλεται κατά κύριο λόγο σε ενζυμική ενεργότητα λακκάσης, ενώ του *I.lacteus* σε υπεροξειδάσες. Η αποικοδόμηση των ΥΑΕ είναι αποτέλεσμα της δράσης των λιγνινολυτικών ενζύμων. Αυτό υποστηρίζεται με πείραμα που στόχο είχε τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά. Προέκυψε ότι η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων ενδοκυτταρικά είναι 2 τάξεις μεγέθους μικρότερη από τη μείωση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου που παρατηρήθηκε και για τα δύο στελέχη. Τέλος, η ικανότητα του *P.citrinopileatus* στον αποχρωματισμό του αποβλήτου σε βιοαντιδραστήρα έφτασε το 84% ενώ παράχθηκε υψηλής συγκέντρωσης βιομάζα.

5.4 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η αποικοδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου με χρήση λιγνινολυτικών μυκήτων είναι μία αποτελεσματική μέθοδος αποτοξικοποίησης, κατά την οποία παράγονται και ένζυμα με σημαντική βιομηχανική χρήση. Ακολουθούν προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.

- ✚ Η μελέτη της δυνατότητας έκφρασης των λιγνινολυτικών ενζύμων (λακκάσες, υπεροξειδάσες) και των λιπασών από τους μύκητες λευκής σήψης είναι πολύ σημαντική, καθώς τα ένζυμα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοκαταλύτες σε ένα πολύ μεγάλο εύρος βιομηχανικών εφαρμογών, όπως στη βιομηχανία χάρτου και στη βιομηχανία τροφίμου [Madhavi et al., 2009]
- ✚ 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, οι συνθήκες χρήσης του (π.χ μη αποστειρωμένο απόβλητο) [Aggelis et al., 2003]

- ✚ Έλεγχος των συνθηκών για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας σε μεγαλύτερη κλίμακα [Blanquez et al., 2002]

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωση 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., Ehaliotis, C., Nerud, F., Stoychev, I., Lyberatos, G., Zervakis, G I., (2002), *Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process*, Appl Microbiol Biotechnol **59**:353–360
- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V., Papanikolaou, S., (2003) *Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using Pleurotus ostreatus in bioreactor cultures and biological evaluation of the process*. Water Research **37**: 3897–3904
- Aktas, E. S., Imre, S. and Ersoy, L., (2001) *Characterization and lime treatment of olive oil mill wastewater*, Water Research, **35**, p.2336
- Andrikopoulos, N.K., Kaliora, A.C., Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P., (2002), *Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low-density lipoprotein oxidation*. Journal of Medicinal Food **5** (No 1) in press
- Arora DS and Sharma RK., (2010), *Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications*
- Asses, N., L. Ayed, H. Bouallagui, I. Ben Rejeb, M. Gargouri, and M. Hamdi.(2009), *Use of Geotrichum candidum for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture*. Biores. Technol. **100**: 2182-2188.
- Azbar, N., Bayram, A., Ayes, F., Ayesn, M., Fusun, S., Ozer, A., (2004), *A review of waste management options in olive oil production*. Critical Reviews on Environmental Science and Technology **34**: 209–247
- 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*, **34**, p.209
- 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, **28**:3-22

- Blaquez P., Caminal G., Sarra M., Vicent M. T., Gabarrell X., (2002), *Olive Oil Mill Waste Waters Decoloration and Detoxification in a Bioreactor by the White Rot Fungus Phanerochaete flavid-alba*, *Biotechnol. Prog.*, **18**: 660–662
- Blodig, W., Smith, A.T., Doyle, W.A., Piontek, K., (2001), *Crystal structures of pristine and oxidative processed lignin peroxidase expressed in Escherichia coli and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism*, *J.Mol.Biol.* **305**: 851-861
- 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. Commum.* **93**: 454-461
- 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
- Caputo, A. C., Scacchia, F. and Pelagagge, P. M., (2003) Disposal of byproducts in olive oil industry: waste to energy solutions, *Applied Thermal Engineering*, 23, p.197
- 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
- De Lorgeril M., Renaud S., Mamelle N., Salen P., Martin JL., Monjaud I., Guidollet J., Touboul P., Delaye J., (1994), *Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease* , *The Lancet* **343**:1454-9
- 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
- Dorado J, Almendros G, Camarero S, Martinez AT, Vares T, and Hatakka A., (1999), *Transformation of wheat straw in the course of solid-state*

- fermentation by four ligninolytic basidiomycetes*, Enzyme Microb. Technol **25**: 605-612
- Eaton RA, and Hale MDC., (1993), *Wood. Decay, pests and protection*, Chapman & Hall, Cambridge, Great Britain
 - Ehlers, G.A. and Rose, P.D (2005), *Bioresource Technology* **96**, 1264
 - Eriksson KEL, Blanchette RA, and Ander P., (1990), *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*, Springer-Verlag, Germany
 - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2012) FAOSTAT database <http://faostat.fao.org/site/666/default.aspx>
 - Fountoulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Aggelis G.G., Lyberatos G., (2002), *Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus Pleurotus ostreatus*, Laboratory of Biochemical Engineering & Environmental Technology, Department of Chemical Engineering, University of Patras, Water Research **36**: 4735–4744
 - Gadd G. M., (2001), *Fungi in Bioremediation*, 2nd ed., Cambridge University Press
 - 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, Kuwahara A, Chiu A, and Glen JK., (1984), *Purification and characterization of an extracellular of an extracellular H₂O₂-requiring diarylpropane oxygenase from the white rot basidiomycete, Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys., **234**: 353-362
 - Gold, M. H., Wariishi, H. and Valli, K., (1989), *Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. In Biocatalysis in Agricultural Biotechnology ed. Whitaker, J. and Sonnet, P. Toronto, Ontario, Canada: American Chemical Society. 127-140
 - Gregori, A., M. Švagelj, B. Pahor, M. Berovič, and F. Pohleven ,(2008), *The use of spent brewery grains for Pleurotus ostreatus cultivation and enzyme production*. New Biotechnology **25**: 157-161.
 - Harris D.C., (2007), *Quantitative Chemical Analysis*, 7th edition, W. H. Freeman and Company
 - Hattaka A., (1994), *Lignin-modifying enzymes from selected white rot fungi, production and role in lignin degradation*. FEMS Microbiol. Rev.**13**: 125-135
 - 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
 - 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
- IMPEL (2003) IMPEL Olive Oil Project Report European Union Network for the implementation and enforcement of Environmental Law. http://impel.eu/wp-content/uploads/2012/10/olive_oil_impel_report_main.pdf
- Imrolive (2000) Improvements of treatments and validation of the liquid-solid waste from the two-phase olive oil extraction, EU Project FAIR CT961420
- Jurasek I., (1995), *Toward a three-dimensional model of lignin structure*. J. Pulp and Paper Sci., **21**: 274-279
- Kaim W. and Rall J., (1996), *Copper-a modern bioelement*. Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. **35**: 43-60
- Kallio, J.P., Rouvinen, J., Kruus, K., Hakulinen, N., (2011), *Probing the dioxygen route in Melanocarpus albomyces laccase with preossurized xenon gas*, Biochemistry **50**: 4396-4398
- Kapellakis I.E., Tsagarakis K.P., Crowther J.C., (2008) Olive history, production and by-product management, *Rev Environ Sci Biotechnol* 7, pp. 1-26
- Kerem, Z., Friesem, D. and Hadar, Y., (1992), *Linocellulose degradation during solid-state fermentation: Pleurotus ostreatus versus Phanerochaete chrysosporium*, Applied and Environmental Microbiology, **58**: 1121-1127
- 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
- Kirk TK., Farrell RL., (1987), *Enzymatic combustion. The microbial degradation of lignin*, Annu. Rev. Microbiol, **41**:465-505
- Kissi, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G., Giardina, P. and Sannia, G., (2001), *Roles of two white-rot basidiomycetes fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water*, Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 57, pp 221–226
- Koutrotsios G., Zervakis G.I., (2014), *Comparative Examination of the Olive Mill Wastewater Biodegradation Process by Various Wood-Rot Macrofungi*, Research Article, BioMed Research International Article ID 482937
- 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 Phanarechaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Comm, **178**: 1092-1098
- Leontievsky, A.A., Myasoedova, N.M., Baskunov, B.P., Evans C.S and Golovleva, L.A., (2000), Biodegradation. **11**, 331
 - Leonowicz A, Matuzewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtas wasilewska M, Cho NS, Hofrichter M, and Rogalski J, (1999), Biodegradation of lignin by white rot fungi, *Fundal Genet. Biol.*, **27**: 175-185
 - Lesage-Meessen L., Navvaro D., Maunier S., Sigoillot J-C., Lorquin J., Delattre M., Simon J-L., Asther M., and Labat M., (2001) Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems, *Food Chemistry* **75**:501-507
 - Maciel MJM., Silva AC., Ribeiro HCT., (2010), *Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review*, Brazil
 - Madhavi V., S.S Lele., (2009), *Laccase: Properties and applications*, BioResources 4(4), 1967-1717
 - 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
 - Martinari, L., Giardina, P., Marzullo, L. and Sannia, G., (1996), *Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the lignolytic fungus Pleurotus ostreatus*, Water Research, **30**: 1914-1918
 - Martinez-Gonzalez M. A., Alonso A., Fernandez-Jarne E., de Irala J., (2003) Letter to the Editor. *Atherosclerosis* **166**: 405-407
 - Mekki, A., Dhouib, A., Sayadi, S., (2007) Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters. *Journal of Environmental Management* **84**: 134–14
 - Mester T. and Tien M., (2000), *Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants*. Int. Biodeter. Biodegrad. **46**: 51 – 59
 - Mitrakas M., Papageorgiou G., Doloslis A., and Sakellaropoulos G. (1996) *Evaluation of various pretreatment methods for olive oil mill wastewaters*, European Water Pollution Control **6** (6): 10-16
 - Nelson, D. and Cox, M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd Edition. Worth Publishers, New York, NY, USA
 - Niaounakis, M. and Halvadakis, P. C., (2004), *Olive-Mill Waste Management: Literature Review and Patent Survey*, Typothito-George Dardanos, Athens

- Niku, P.M.L. and Viikari, L., (2000), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**, 435
- 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
- Osma, C.J.F., (2009), *Production of laccase by the white rot fungus Trametes pubescence for their potential application to synthetic dye treatment*. Doctoral Thesis, Universitat Rovira Virgili
- Osono T., (2007) *Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition*, *Ecological Research* **22**: 955-974
<http://www.mykoweb.com/articles/DeconstructingDecomposing.html>
- Paraskeva P., Diamadopoulos E., (2006) Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review, *J Chem Technol Biotechnol* **81**: 1475-1478
- Popp JL, Kalyanaraman B, and Kirk TK., (1990), *Lignin peroxidase oxidation of Mn⁺² in the presence of veratryl alcohol, malonic or oxalic acid, and oxygen*. *Biochemistry*, **29**: 10475-10480
- 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
- Rinaldi M., Rana G., Introna M., (2003) Olive oil wastewater spreading in southern Italy: effects on a durum wheat crop, *Field Crops Res* **84**:319-326
- Rozzi, A. and Malpei, F., (1996) Treatment and Disposal of Olive Mill Effluents, *International Biodeterioration and Biodegradation*, pp.135-144
- Sanjust, E., Pompei, R., Rescigno, A., Rinaldi, A. and Ballero, M., (1991), *Olive milling wastewater as a medium for growth of four Pleurotus species*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **31**: 223-235
- Sayadi, S. and Ellouz, R., (1992), *Decolourization of olive mill wastewaters by the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium: involvement of the lignin-degrading system*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **37**: 813-817
- Servili, M., Esposito, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., Selvaggini, R., Montedoro, GF. (2009) Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology* **17** (2):76-84

- Shrivastava, R., V. Christian, and B. R. M. Vyas (2005) Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes. *Enz. Microb. Technol.* **36**: 333-337. 22.
- Singh, D. and S. Chen (2008) The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 399-417. 23
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M.H., Poulos, T.L., (1994), *Preliminary crystallographic analysis of manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium*, *J.Mol.Biol.* **238**: 845-848
- Tien M. and Kirk TK., (1983), *Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete Phanerochaete chrysosporium*. *Burds. Science*, **221**: 661-663
- Thurston CF., (1994), *The structure and function of fungal laccases* *Microbiology*, **140**: 19-26
- Wariishi, H., Akileswaran, L. and Gold, M. H., (1988), *Manganese peroxidase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle*. *Biochemistry* **27**: 5365-5370
- 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, 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
- Zaharaki D., and Komnitsas K., (2009) Exciting and emerging technologies for the treatment of olive oil mill wastewaters, *International Conference AMIREG 2009 "Towards sustainable development: Assessing the footprint of resource utilization and hazardous waste management"*, Athens, 7-9 September
- Zervakis, G and Balis, C., (1996) Bioremediation of olive oil mill wastes through the production of fungal biomass, In: *Proceedings of the 2nd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, (ed. Royse, D.-J.), Publisher: Pennsylvania State University, College of Agricultural Sciences, University Park, Pennsylvania pp.311-323

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Βλυσίδης Α., Γρηγοροπούλου Ε., Λυμπεράτος Γ., (2014), *Θερμική Επεξεργασία Απορριμμάτων: Περιβαλλοντική Μηχανική-Σημειώσεις Παραδόσεων*, ΕΠΜ, Αθήνα
- Δρίτσα Β., (2006), *Διδακτορική διατριβή: Μελέτη της αποδόμησης τοξικών ουσιών με λιγνινολυτικούς μύκητες*, ΕΜΠ

- Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον, (2013), Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα
- Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων (2013), Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων, *Εργαστηριακές Ασκήσεις 8^{ου} εξαμήνου*, ΕΜΠ
- Καψακάνη-Γκότση Ε., (2000), *Συστηματική και Οικολογία Μυκήτων-Εργαστηριακές Ασκήσεις*, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Κώτσου Μ., (2002) Διδακτορική διατριβή: *Επίδραση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στην επισκευτική δράση του εδάφους*, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής
<http://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/14383>
- Λοϊζίδης Μ., (2009) Διδακτορική διατριβή: *Επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη μέθοδο της συγχουμοποίησης τους με πυρηνόξυλο*, ΕΜΠ, Σχολή Χημικών Μηχανικών
<http://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/17842>
- Λυμπεράτος Γ., Βαγενάς Δ., (2012), Φυσικές και Χημικές Διεργασίες για την Επεξεργασία Υγρών Αποβλήτων: *Διαχείριση Υγρών Αποβλήτων*, ΤΖΙΟΛΑ ,pp. 377-388
- Μπλίκια Π., (2008) Διδακτορική διατριβή: *Βιοτεχνολογικές μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου*, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Χημικών Μηχανικών
<http://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/14383#page/62/mode/2up>
- Ντόλια Σ., (2006) Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών: *Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων-Ανασκόπηση Ερευνών και Προβλήματα*, Πανεπιστήμιο Πειραιά, Τμήμα Οργάνωσης και Διοίκησης Βιομηχανικών Διεργασιών, ΕΜΠ, Σχολή Χημικών Μηχανικών
<http://digilib.lib.unipi.gr/dspace/bitstream/unipi/1611/1/Ntolia.pdf>
- Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., (2013), *Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων*, ΕΜΠ, Αθήνα, pp. 29-41
http://www.bcua.org/WPC_VT