Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Τομέας IV : Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Διπλωματική Εργασία

Αποτοξικοποίηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου Με Χρήση Κατάλληλων Ενζυμικών ή Μικροβιακών Βιοκαταλυτών

Σπυρίδων Κούκας

Επιβλέπων Καθηγητής: Ευάγγελος Τόπακας

Αθήνα 2019

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς όλους εκείνους που συνέβαλαν στην επιτυχή της πραγματοποίηση και συγγραφή.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ευάγγελο Τόπακα, Επίκουρο Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και υπεύθυνο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ανάθεση του θέματος και τις καίριες επιστημονικές συμβουλές σε ό,τι αφορά την εκπόνηση και την ολοκλήρωση της.

Επιπροσθέτως, θέλω να ευχαριστήσω κάθε ένα ξεχωριστά από τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη βοήθεια τους και την αγαστή συνεργασία τους σε διάφορα θέματα επιστημονικού ενδιαφέροντος, αλλά και εκτέλεσης των απαιτούμενων πειραματικών διαδικασιών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τα άτομα του φιλικού μου κύκλου και την επί χρόνια σύντροφο μου, Κατερίνα, για την υποστήριξη που μου προσέφεραν καθόλη τη διάρκεια των ακαδημαϊκών μου σπουδών.

Περιεχόμενα

Περίληψη..... I

Abstract..... II

1. Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείου

1.1 Εισαγωγή..... 1
1.2 Ελαιοκαρπός..... 4
1.3 Παραραβή κι Επεξεργασία Ελαιολάδου – Τύποι Ελαιουργείων..... 5
1.4 Ελαιουργικά Απόβλητα..... 9
1.4.1 Στερεά Απόβλητα Ελαιοτριβείου..... 10
1.4.2 Αέρια Απόβλητα Ελαιοτριβείου..... 11
1.4.3 Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου..... 11
1.5 Διαχείρηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου..... 13
1.6 Περιβαλλοντικές Επιπτώσεις Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου..... 14
1.7 Μέθοδοι Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου..... 15
1.7.1 Φυσικοχημικές Μέθοδοι..... 16
1.7.2 Συγκομποστοποίηση..... 19
1.7.3 Αναερόβια Ζύμωση με σκοπό την Παραγωγή Βιοαερίου..... 19
1.7.4 Παραγωγή Βιοαποικοδομήσιμων Υλικών..... 20
1.7.5 Ελεγχόμενη Εναπόθεση σε Εδαφικούς Αποδέκτες..... 20
1.7.6 Αποδόμηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου με Χρήση Μικροοργανισμών (Βιολογική Επεξεργασία)..... 20

2. Λιγνινολυτικοί Μύκητες

2.1 Μακρομύκητες – Το γένος Pleurotus..... 21
2.2 Το γένος Irpex..... 22
2.3 Λιγνινοκυτταρίνη..... 24
2.4 Λιγνινοκυτταρικά Ένζυμα..... 25
2.4.1 Λακκάση..... 26
2.4.2 Υπεροξειδάση της Λιγνίνης..... 28
2.4.3 Υπεροξειδάση του Μαγγανίου..... 30
2.4.4 Εφαρμογές Υπεροξειδασών/λιγνινολυτικών ενζύμων στη βιοτεχνολογία..... 31

3. Πειραματικό Μέρος

3.1 Υλικά..... 33
3.1.1 Μικροοργανισμοί..... 33
3.1.2 Χημικά Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά..... 34
3.1.3 3.1.3 Ρυθμιστικά Διαλύματα..... 34
3.1.4 Θρεπτικά Υποστρώματα..... 35
3.1.5 Όργανα – Συσκευές..... 36
3.1.6 Πλασμιδιακοί Φορείς Έκφρασης και Κλωνοποίησης..... 38
3.6.1.1 pCR Blunt..... 38
3.6.1.2 pPICZaC/pPICZaA..... 38

3.2 Καλλιέργειες Μικροοργανισμών..... 40
3.2.1 Στερεές και Υγρές Καλλιέργειες Βασιδιομυκήτων..... 40
3.2.1.1 Στερεές Καλλιέργειες..... 40
3.2.1.2 Υγρές Καλλιέργειες Μικρής Κλίμακας..... 40
3.2.1.3 Ανάπτυξη Βασιδιομυκήτων σε Βιοαντιδραστήρα..... 40
3.2.1.4 Προσδιορισμός Αναγωγικών Σακχάρων..... 41
3.2.1.5 Προσδιορισμός Φαινολικού Φορτίου..... 41
3.2.1.6 Προσδιορισμός Ενεργότητας Λακκάσης..... 42
3.2.1.7 Αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου..... 42
3.2.2 Υγρές και Στερεές Καλλιέργειες του Μύκητα Myceliophthora Thermophila..... 43
3.2.3 Υγρές και Στερεές Καλλιέργειες Βακτηρίων..... 43
3.2.4 Υγρές και στερεές καλλιέργειες Ζυμομυκήτων..... 43
3.2.4.1 Στερεές Καλλιέργειες του μύκητα P. Pastoris για επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων..... 43
3.3 Μοριακές Τεχνικές.....44
3.3.1 Απομόνωση Γενετικού Υλικού – Ανάλυση Γενωμικού DNA..... 44
3.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA..... 44
3.3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης..... 44
3.3.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης..... 45
3.3.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – Επικαλυπτόμενη PCR..... 45
3.3.6 Απομόνωση Εσωνίων από αλληλουχία DNA..... 46
3.3.7 Συνένωση Μορίων DNA (Ligation)..... 47
3.3.8 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες..... 47
3.3.9 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων βακτηρίων και μυκητών..... 48
3.3.9.1 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων E. coli Top10..... 48
3.3.9.2 Μετασχηματισμός μέσω θερμικού σοκ..... 48
3.3.9.3 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων Pichia Pastoris..... 49
3.3.9.4 Μετασχηματισμός κυττάρων P. Pastoris με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)..... 49

4. Αποτελέσματα Πειραματικών Διαδικασίων
4.1 Μικροβιακή Αποικοδόμηση Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου με χρήση στελεχών Βασιδιομυκήτων..... 50
4.2 Εύρεση Βέλτιστου pH καλλιέργειας..... 51
4.2.1 Μέτρηση Ενζυμικής Ενεργότητας Λακκάσης..... 51
4.2.2 Μετρήσεις Βιομάζας..... 53
4.2.3 Μέτρηση Φαινολικών Ενώσεων..... 54
4.2.4 Αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου..... 55
4.3 Βέλτιστος Ρυθμός Ανάδευσης Καλλιέργειας..... 56
4.3.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης..... 56
4.3.2 Μετρήσεις Βιομάζας..... 58
4.3.3 Φαινολικές Ενώσεις – Μετρήσεις..... 58

4.3.4 Αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργέιου…… 59
4.3.5 Αναγωγικά Σάκχαρα – Μετρήσεις…….. 60
4.4 Βέλτιστη Πηγή Αζώτου – Εύρεση και Μετρήσεις…….. 61
4.4.1 Ενζυμική Ενεργότητα Λακκάσης – Μετρήσεις…….. 61
4.4.2 Βιομάζα – Μετρήσεις…….....
63
4.4.3 Φαινολικές Ενώσεις – Μετρήσεις…….. 64
4.4.4 Αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου…….. 65
4.4.5 Αναγωγικά Σάκχαρα – Μετρήσεις…….. 66
4.4.6 Ενζυμική Ενεργότητα Υπεροξειδάσης της Λιγνίνης – Μετρήσεις…….. 67
4.4.7 Ενζυμική Ενεργότητα Λιπάσης – Μετρήσεις…….. 68
4.4.8 Ενζυμική Ενεργότητα Υπεροξειδάσης του Μαγγανίου – Μετρήσεις..... 69
4.5 Ζυμογραφήματα…….. 70
4.6 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός της υπεροξειδάσης MtPerII του M. Thermophila..... 71
4.6.1 Απομόνωση γονιδίου MtPerII από το γονιδίωμα του M. Thermophila 72
4.6.2 Κλωνοποίηση σε pCR Bunt – Αφαίρεση Εσωνίων…… 72
4.6.3 Κλωνοποίηση σε pPICZa και γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου φορέα..... 75
4.6.4 Ανάλυση μετασχηματισμένων κλώνων P. Pastoris…….. 75
4.6.5 Παραγωγή και απομόνωση της MtPerII…….. 76
4.6.6 Χαρακτηρισμός της ετερόλογης MtPerII…….. 77

5. **Συμπεράσματα – Ερμηνεία Αποτελεσμάτων**
5.1 Αποτοξικοποίηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου με χρήση επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων..... 79
5.2 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός λιγνινολυτικών ενζύμων του μύκητα M. Thermophila..... 81
5.3 Γενικά Συμπεράσματα..... 81
5.4 Μελλοντικοί στόχοι Εφαρμογές..... 82

6. **Βιβλιογραφία**..... 83

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο τη μελέτη της αποτοξικοποίησης Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου με χρήση κατάλληλων ενζυμικών ή μικροβιακών βιοκαταλυτών αλλά και την περαιτέρω διερεύνηση του βιοτεχνολογικού δυναμικού των λιγνινολυτικών μυκητών, οι οποίοι και χρησιμοποιήθηκαν, τόσο σε επίπεδο ολόκληρων των οργανισμών και των καλλιεργειών τους, όσο και των επιμέρους ενζυμικών συστημάτων εκείνων στα οποία και οφείλεται η οξειδωτική διάσπαση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.

Σε ό,τι αφορά την αποτοξικοποίηση στα Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείου, τα οποία και αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα επιμόλυνσης περιοχών σε χώρες παραγωγής ελαιολάδου, λόγω του υψηλού οργανικού τους φορτίου και της υψηλής τους συγκέντρωσης σε φαινολικές ενώσεις, έγινε χρήση των μυκητών λευκής σήψης Pleurotus Citrinopileatus και Irpex Lacteus. Οι μύκητες λευκής σήψης μπορούν να αποικοδομήσουν τη λιγνίνη με έκκριση ενζύμων, τα οποία μπορούν να καταταχθούν ως i) φαινολικές οξειδάσεις (όπου ανήκει η λακκάση) και ii)υπεροξειδάσες (όπου ανήκουν οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης και του μαγγανίου). Εξετάστηκαν οι παράγοντες που αφορούσαν το pH της εκάστοτε καλλιέργειας, ο ρυθμός ανάδευσης εκείνων και η διαθέσιμη πηγή αζώτου κάθε φορά, με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για υψηλότερη αποδόμηση του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου.

Σχετικά με τη μελέτη και αξιοποίηση του ενζυμικού δυναμικού των λιγνινολυτικών μυκητων, το γονίδιο του θερμόφιλου ασκομύκητα Myceliophthora Thermophila το οποίο εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του μικροοργανισμού, κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλους φορείς και εκφράστηκε ετερόλογα στη ζύμη Pichia Pastoris. Στο ένζυμο που προέκυψε βρέθηκε ενεργότητα υπεροξειδάσης και ονομάστηκε MtPerII. Σε αυτό, βρέθηκε πως μπορεί να οξειδώσει εύρος φαινολικών υποστρωμάτων, αλλά χαρακτηρίστηκε και ιδιαίτερα θερμοσταθερό, μα και ανθεκτικό σε συνθήκες περίσσειας H_2O_2.

Abstract

The present diploma thesis had main aim the examination of the detoxification of olive oil mill wastes by using suitable enzymatic or microbial biocatalysts and the further investigation of the biotechnological potential of the ligninolytic fungi, at the whole cell level as well as at the level of the enzymatic systems responsible for the oxidative degradation of lignocellulosic biomass.

In regard of the detoxification of the olive oil mill wastes, a product that poses serious problems for olive oil producing countries due to its high organic load and its high concentration of phenol compounds, white rot fungi were used, and more specifically Pleurotus Citrinopileatus and Irpex Lacteus. White rot fungi degrade lignin by secreting enzymes that can be classified as either phenol oxidases (laccase) or peroxidases (lignin peroxidase and manganese peroxidase). Factors related to the pH of each culture, their agitation rate and the available nitrogen source at each time were examined in order to find the optimum conditions for the higher degradation of the olive oil mill wastes.

In the study and exploitation of the enzymatic potential of ligninolytic fungi, the Myceliophthora Thermophila thermophilic gene which is involved in the degradation of ligninocellulose, was isolated from the genome of M. Thermophila, cloned in suitable vectors and expressed heterologously in Pichia Pastoris. The resulting enzyme were found to exhibit peroxidase activity and was called MtPerII. In this, it was found to be able to oxidize a range of phenolic substrates, but was also found to be particularly thermostable and resistant to excess H2O2.

Κεφάλαιο 1: Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείου

1.1. Εισαγωγή

Η ιστορία και ύπαρξη της ελιάς είναι αναντίρρητα συνδεδεμένη με τους ανθρώπους και τους πολιτισμούς της λεκάνης της Μεσογείου. Έτσι, από αρχαιοτάτων κιόλας χρόνων κάνει την εμφάνιση της στους μύθους, τις παραστάσεις και την καθημερινότητα των λαών της, αποτελώντας ανέκαθεν σύμβολο αγώνων, ευημερίας, ειρήνης, γονιμότητας κι ευφορίας.

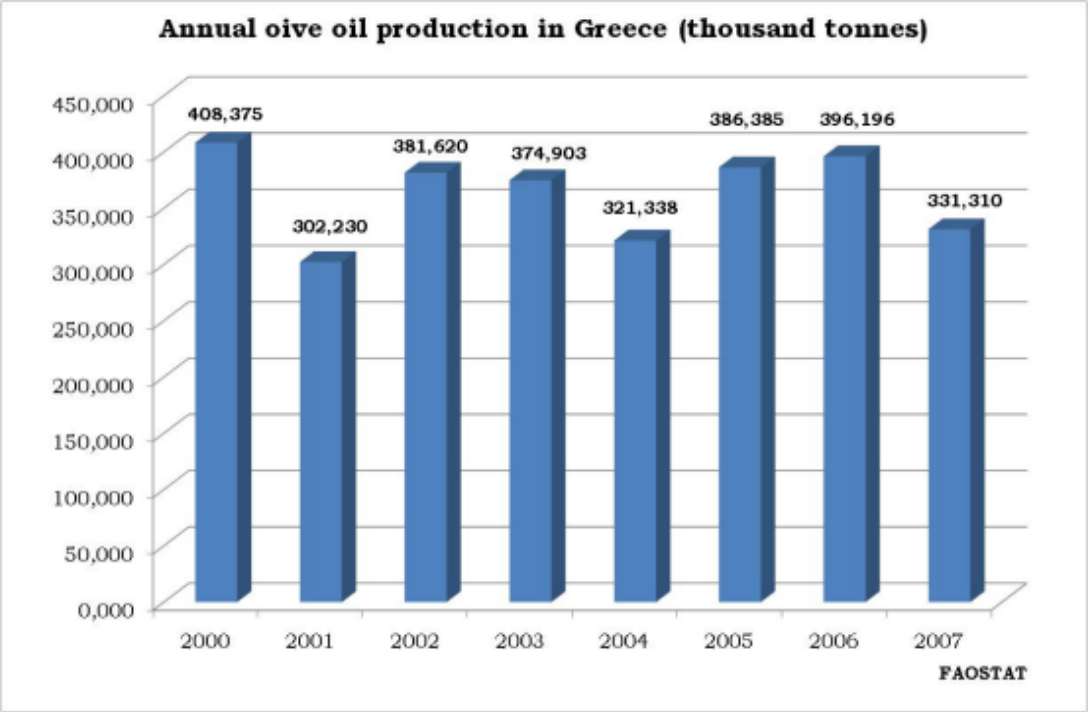
Με την καλλιέργεια του ελαιολάδου να χάνεται στα βάθη των αιώνων και την εν γένει ύπαρξη της να κρατά από ακόμη παλαιότερα , δεν προκαλεί εντύπωση πως απολιθώματα ελιάς έχουν βρεθεί στο Λιβόρνο της Ιταλίας, τα οποία χρονολογούνται 20 εκατομμύρια χρόνια πριν, ενώ η καλλιέργεια της υπολογίζεται ότι ξεκίνησε στον ευρύτερο χώρο της Μεσογείου πριν από περίπου 7.000 χρόνια. Σε ό,τι αφορά τη χώρα μας, οι πρώτες μαρτυρίες για την καλλιέργειά της στον ελλαδικό χώρο, σύμφωνα με τα αρχαιολογικά ευρήματα, πιθανολογείται πως ξεκίνησε στην Κρήτη, πριν από 3.500 περίπου χρόνια.

Η ελιά αποτέλεσε το άτυπο σύμβολο της Ελλάδας κατά την αρχαιότητα και το ελαιόλαδο χρησιμοποιούνταν όχι μόνο για τις θρεπτικές του αξίες, αλλά και για φαρμακευτικούς και άλλους σκοπούς. Η συμβολική σημασία της ελιάς, όπως και η κοινωνική και οικονομική αξία του ελαιόλαδου, διείσδυσε σε όλους τους τομείς της ζωής εκείνης της περιόδου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γεγονός πως το κλαδί της ελιάς υπήρξε το έπαθλο στους Ολυμπιακούς Αγώνες από το 776 π.Χ. και συμβόλιζε την ειρήνη και την υποχρεωτική ανακωχή των όποιων εχθροπραξιών κατά τη διάρκεια των Αγώνων, ενώ αντίστοιχα η μεγαλύτερη τιμή για τους νικητές των Παναθήναιων, που λάμβαναν χώρα κάθε τετραετία στην Αθήνα προς τιμήν της θεάς Αθηνάς ήταν αμφορείς γεμάτοι με ελαιόλαδο.

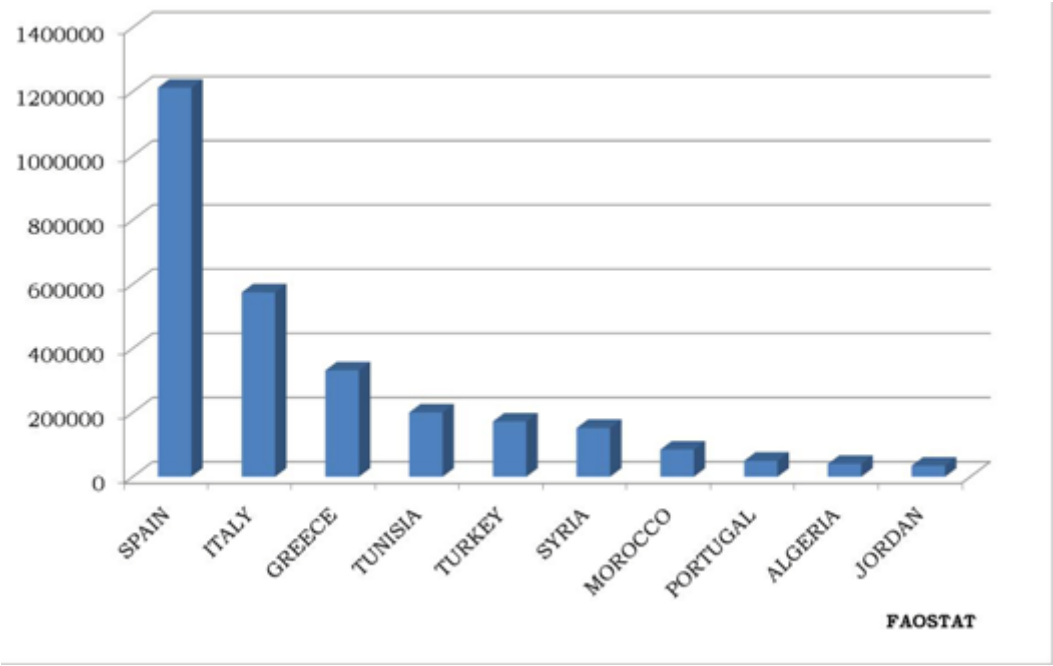
Με την παραγωγή ελαιόλαδου στις Ελληνικές περιοχές να συνεχίζεται και κατά τη διάρκεια της Βυζαντινής εποχής, η Βυζαντινή Αυτοκρατορία έκανε την μεγαλύτερη εξαγωγή λαδιού παγκοσμίως, δίχως η παραγωγή ελαιολάδου να επηρεάζεται ιδιαίτερα από την πτώση της Κωνσταντινούπολης το 1453 και το τέλος της Βυζαντινής εποχής. Το δένδρο και το λάδι, εκείνη την εποχή, είχε καταλάβει ένα σημαντικό μέρος και στα τελετουργικά δρώμενα της Ορθόδοξης Χριστιανικής εκκλησία, όπως η βάπτιση μεταξύ άλλων. Έτσι, δεν προκαλεί έκπληξη πως η ελιά και οι καρποί της διαδραματίζουν ακόμη και σήμερα πολύ σημαντικό ρόλο στην κοινωνική κουλτούρα της χώρας όπως και στην οικονομική ζωή της, με την Ελλάδα να κατατάσσεται ως η τρίτη ελαιοπαραγωγική δύναμη σε παγκόσμιο επίπεδο.

Καθώς ο αριθμός των ελαιόδεντρων που καλλιεργούνται κάθε χρόνο σε παγκόσμια κλίμακα ξεπερνά τις 750 εκατομμύρια μονάδες, οι οποίες καλύπτουν επιφάνεια

επτά εκατομμυρίων εκταρίων, είναι τουλάχιστον ενδιαφέρον το γεγονός πως το 97% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου παράγεται από τις χώρες της Μεσογείου. Κάθε ελαιόδεντρο παράγει από 15 έως 40 κιλά ελαιοκάρπου το χρόνο, ενώ η μεγαλύτερη παραγωγή ελαιολάδου προέρχεται από τη νότια Ευρώπη, τη βόρειο Αφρική και την Εγγύς Ανατολή. Από τα ευρωπαϊκά παραγωγικά εδάφη, το 93% της παραγωγής προέρχεται από την Ιβηρική χερσόνησο, την Ιταλία και την Ελλάδα. Η Ισπανία κατέχει τα πρωτεία στην παραγωγή και την εξαγωγή ελαιοκάρπων κι ελαιολάδου ενώ στο έδαφός της καλλιεργούνται κάτι παραπάνω από 300 εκατομμύρια ελαιόδεντρα. Αντιστοίχως κι όπως προαναφέρθηκε, η εγχώρια ελαιοπαραγωγή συμπεριλαμβάνεται ανάμεσα στις ηγετικές δυνάμεις του χώρου, μιας και στα ελληνικά εδάφη καλλιεργούνται περισσότερα από 132 εκατομμύρια ελαιόδεντρα, από τα οποία παράγονται περίπου 350.000 τόνοι ελαιολάδου ετησίως (Prosodol).

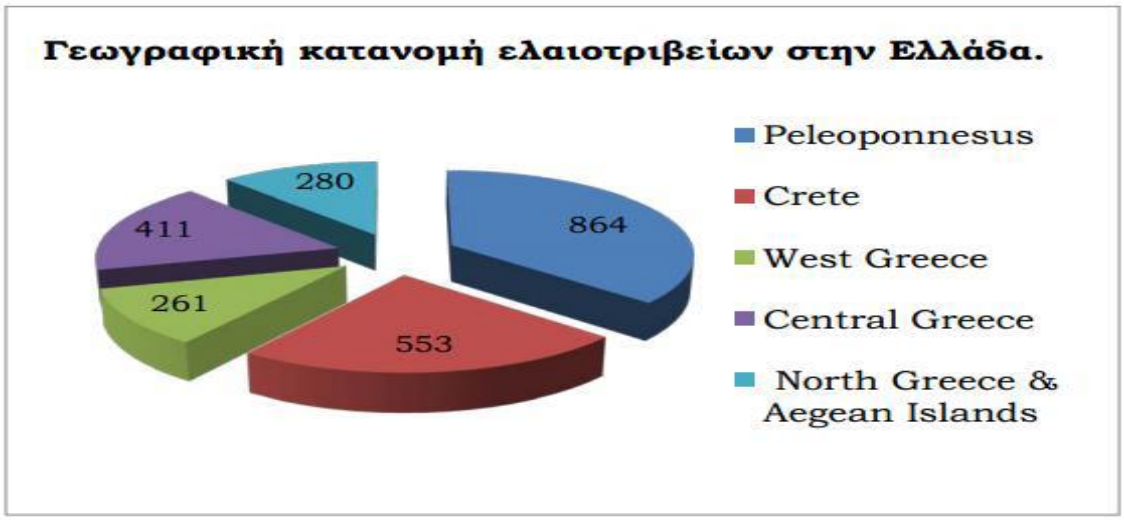


Πίνακας 1.1: Ετήσια ελληνική παραγωγή ελαιολάδου (FAOSTAT)



Πίνακας 1.2: Παγκόσμια παραγωγή ελαιολάδου (FAOSTAT)

Ενδιαφέρον στατιστικό στοιχείο αποτελεί το γεγονός πως, σε ποσοστό σχεδόν 50%, η ετήσια ελληνική παραγωγή ελαιολάδου εξάγεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση, με την Ιταλία να αποτελεί τον κυριότερο αποδέκτη. Ταυτοχρόνως, οι σημαντικότερες ελαιοπαραγωγικές περιοχές στην Ελλάδα βρίσκονται στα εδάφη της Πελοποννήσου, η οποία ευθύνεται για το 65% περίπου της συνολικής εγχώριας παραγωγής, καθώς επίσης η Κρήτη και τα νησιά του Ιονίου κι Αιγαίου (Prosodol).



Πίνακας 1.3: Γεωγραφική κατανομή εγχώριων ελαιοτριβείων

1.2 Ελαιόκαρπος

Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη, αποτελούμενος από τα μέρη του επικαρπίου (επιδερμίδα), του μεσοκαρπίου (σάρκα) και του ενδοκαρπίου (κουκούτσι).

Δομικά, ο ελαιόκαρπος ομοιάζει με τις υπόλοιπες δρύπες, διαφέροντας κατά κύριο λόγο στη χημική σύσταση. Εκεί, παρατηρούμε τις εξής σημαντικές διαφορές, οι οποίες μπορούν να καταταχθούν σε τρεις ευρείες κατηγορίες, τις παρακάτω:

- Αρχικώς, η νωπή σάρκα του καρπού παρουσιάζει αυξημένη περιεκτικότητα σε έλαιο, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 17% και 30% αναλόγως της ποικιλίας, έναντι του 1,55% περίπου των υπολοίπων δρυπών.
- Ακολούθως, είναι χαρακτηριστική η ελαττωμένη περιεκτικότητα της ελαιοσάρκας σε σάκχαρα, σε σχέση με τις αντίστοιχες ομοιάζουσες δρύπες, η οποία φθάνει έως και το 6% επί της νωπής ελαιομάζας, έναντι του μέσου όρου του 12% των υπολοίπων δρυπών.
- Τέλος, η ύπαρξη της ελευρωπαϊνης (Oleuropein) προσδίδει χαρακτηριστική μοναδικότητα στον ελαιόκαρπο, καθώς δεν συναντάται σε κάποιον άλλο καρπό που γνωρίζουμε. Η ελευρωπαϊνη ανήκει στην οικογένεια των πολυφαινολών, όντας πολική και συνεπώς υδατοδιαλυτή ουσία, στην οποία μπορεί και αποδίδεται η πικρότητα της σάρκας του ελαιοκάρπου.

Τα τμήματα του επικαρπίου και του μεσοκαρπίου μαζί εκφράζονται ως το περικάρπιο του καρπού, το οποίο και αποτελεί το 65 – 83% του συνολικού νωπού βάρους του ελαιόκαρπου. Τα κύρια συστατικά του καρπού της ελιάς διακρίνονται στο νερό (το οποίο αποτελεί περίπου το 50% της σύστασης του), τις λιπαρές ουσίες (σύνθετα λιπίδια), τα διάφορα σάκχαρα, τους υδατάνθρακες (το 19% της σύστασης του), τις διάφορες πρωτεΐνες (οι οποίες περιέχουν την πλειονότητα των θρεπτικών αμινοξέων), καθώς και διάφορες βιταμίνες (Καροτένια, Βιταμίνη C, Θειαμίνη, Τοκοφερόλη) ως επί το πλείστον. Δευτερευόντως, διακρίνονται συστατικά όπως πηκτίνες, οργανικά οξέα, τανίνες, χρωστικές (υδατοδιαλυτές και λιποδιαλυτές) και διάφορα ανόργανα στοιχεία, τα οποία κρίνονται απαραίτητα για την ισορροπημένη ανθρώπινη διατροφή (Μπαλατσούρας, 1995).

Παρ’ όλα αυτά, τα περισσότερα εξ αυτών των συστατικών συναντώνται και στα παραγόμενα κατά τη παραγωγική διαδικασία απόβλητα του ελαιολάδου. Ο καρπός περνάει διάφορες φάσεις έως ότου φτάσει στο μέγιστο μέγεθος του κι αρχίζει ακολούθως να χάνει υγρασία, με αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας του σε έλαιο. Τέλος, το 96-98% του ελαίου στον ελαιόκαρπο συγκεντρώνεται στην περιοχή του περικαρπίου (Ποντίκης, 2000).

1.3 Παραλαβή κι Επεξεργασία του Ελαιολάδου – Τύποι Ελαιουργείων

Οι δύο επικρατούσες διαδικασίες παραγωγής ελαιολάδου, οι οποίες είναι ευρέως διαδεδομένες στις κυρίαρχες μεσογειακές ελαιοπαραγωγικές δυνάμεις, βασίζονται στη φυγοκέντρηση. Ανάλογα με τα επιθυμητά προϊόντα στο τέλος της συνολικής επεξεργασίας του καρπού του ελαιοδέντρου, τα φυγοκεντρικά συστήματα διαχωρίζονται σε συστήματα δύο και τριών φάσεων, τα οποία και θα αναλυθούν λίγο παρακάτω. Συγχρόνως, πρέπει να αναφερθεί τόσο για ιστορικούς, όσο και για λόγους πληρότητας, η μερική χρησιμοποίηση ακόμη και στις μέρες μας των παραδοσιακών μεθόδων παραγωγής ελαιολάδου, που περιλαμβάνει την εξαγωγή του με άσκηση πίεσης στον καρπό μέσω των υδραυλικών πιεστηρίων. Βεβαίως, τα τρία αναφερόμενα συστήματα διαφέρουν σημαντικά σε ό,τι αφορά την ποσότητα της παραγωγής και τη συνολική διαδικασία που απαιτείται, καθώς και την εν γένει ύπαρξη των παραγόμενων παραπροϊόντων της εκάστοτε διαδικασίας (Μπλίκα, 2009).

Έτσι, η επεξεργασία του ελαιολάδου ακολουθεί τα εξής σημεία :

1. *<u>Παραλαβή του καρπού</u>*

Ο τρόπος που γίνεται η συγκομιδή του ελαιόκαρπου εξαρτάται τόσο από την ποικιλία του ελαιόδεντρου όσο και από τον τρόπο καλλιέργειάς του. Οι ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι : α) η συλλογή από το έδαφος, β) η συλλογή κατόπιν ραβδίσματος του ελαιόδεντρου, γ) η συλλογή χρησιμοποιώντας το χέρι, (μαζεύοντας τις ελιές από το δέντρο), δ) η συλλογή με μηχανικό τρόπο και με «χτένια» και ε) με τίναγμα του δέντρου. Από τους παραπάνω τρόπους, η καλύτερη θεωρείται η συλλογή με το χέρι, παρόλα τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει από πλευράς χρόνου και κόστους, λόγω της λιγότερης καταπόνησης του καρπού.

Μετά τη συγκομιδή οι καρποί παραδίδονται στις μεταποιητικές μονάδες για επεξεργασία. Η μεταφορά τους πραγματοποιείται μέσα σε πλαστικές κλούβες με οπές αερισμού ή πλαστικούς σάκους. Σε περίπτωση που απαιτείται η αποθήκευση του καρπού θα πρέπει να είναι για μικρό χρονικό διάστημα σε χώρο με καλό αερισμό.

2. *<u>Καθαρισμός του καρπού</u>*

Η διαδικασία αυτή κρίνεται απαραίτητη λόγω της ύπαρξης κλαδιών και φύλλων του πάνω στα πανιά περισυλλογής του ελαιόκαρπου και τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν, καθώς αν παραμείνουν κατά τη διαδικασία της ελαιοποίησης, προσδίδουν πικρή γεύση στο παραγόμενο λάδι. Έτσι, για να να καθαριστεί η συλλεγμένη ποσότητα καρπών κοσκινίζεται ή λιχνίζεται.

3. *Άλεση ελαιοκάρπου*

Αναλόγως της μεθόδου και της διαθέσιμης τεχνολογίας, η άλεση του ελαιοκάρπου συμβαίνει είτε με κυλινδρικές μυλόπετρες στα πιο παραδοσιακά ελαιοτριβεία, είτε με μεταλλικούς μύλους, σφυρόμυλους και σπαστήρες με οδοντωτούς δίσκους στα πιο σύγχρονα ελαιοπαραγωγικά κέντρα. Επίσης, ανάλογα με την ξηρότητα και τη θερμοκρασία του καρπού, προστίθεται μια μικρή ποσότητα νερού, συνήθως της τάξεως των 150 L ανά 1 tmt ελαιοκάρπου.

4. *Μάλαξη*

Κατόπιν της αλέσεως, η ελαιοζύμη που προέκυψε εισάγεται στο μαλακτήρα, προσθέτοντας και κάποια ποσότητα ζεστού νερού (περίπου το 10% της ελαιοζυμικής ποσότητας). Η διαδικασία της μαλάξεως επιτυγχάνει τη συνένωση των μικρότερων σταγονιδίων ελαίου με τις μεγαλύτερες σε μέγεθος σταγόνες, ενώ για την ευκολότερη τέλεση της πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 28 – 30°C.

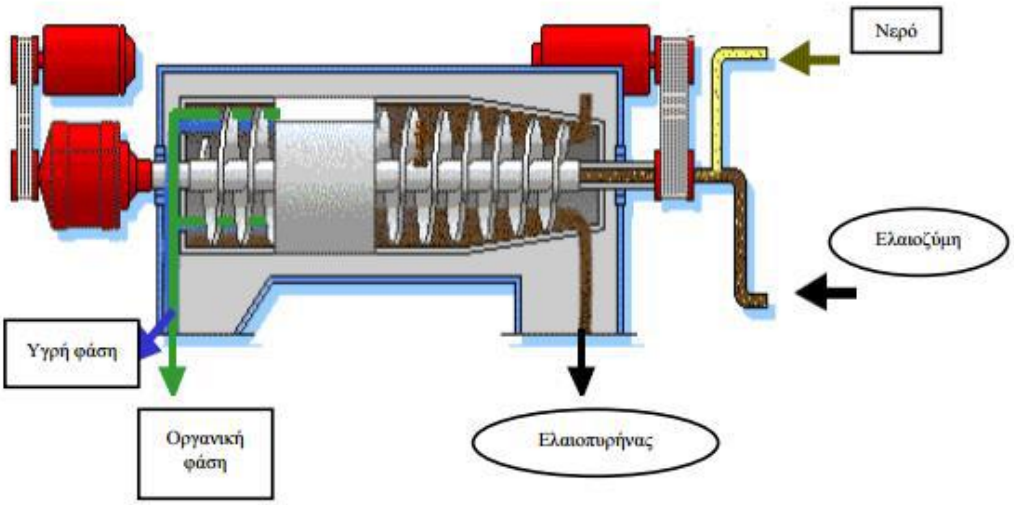
5. *Εξαγωγή ελαιολάδου από ελαιοζύμη*

Οι διαδικασίες που ακολουθούνται για την εξαγωγή ελαιολάδου περιλαμβάνουν τις πρακτικές της πιέσεως, της διηθήσεως και της φυγοκέντρισης. Προϊόν αυτών των διαδικασιών αποτελεί το ελαιόλαδο, ενώ παραπροϊόντα τα υγρά (κατσίγαρος) και στερεά (ελαιοπυρήνας) απόβλητα.

Κατά την παραδοσιακή μέθοδο, υπάρχει διαφοροποίηση σε δύο φάσεις με την πίεση των αλεσμένων καρπών (ελαιοζύμη), όπου κατόπιν η υγρή φάση (μίγμα νερού/λαδιού) διαχωρίζεται ώστε να ληφθεί το ζητούμενο ελαιόλαδο. Εντούτοις, αν και οικολογικότερη, η τεχνική αυτή είναι ασυνεχής, γεγονός μειονεκτικό για τις σύγχρονες βιομηχανικές ανάγκες.

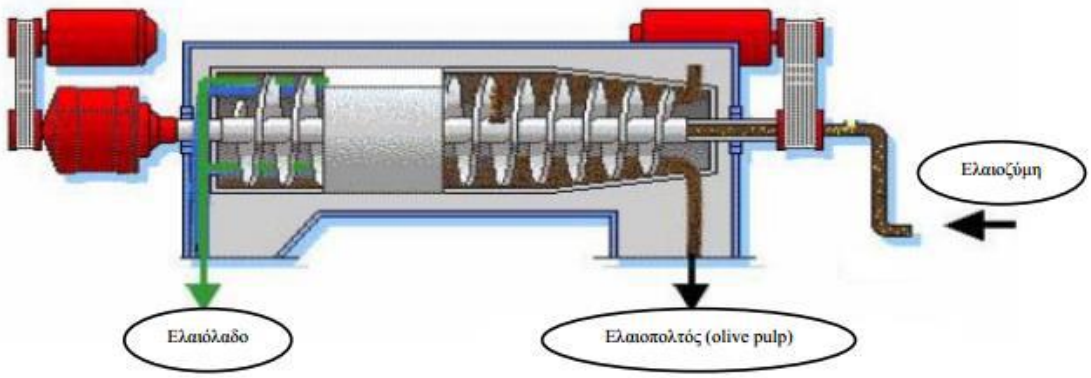
Σε ό,τι αφορά τις μεθόδους του τριφασικού και διφασικού διαχωρισμού, οι οποίες έχουν αντικαταστήσει την παραδοσιακή μέθοδο κατά ένα μεγάλο ποσοστό πλέον, χαρακτηρίζονται από σημαντική παραγωγική ικανότητα, αλλά διακρίνονται για τις διαφορές που τις διέπουν.

Στην τριφασική διαδικασία η ελαιοζύμη εισάγεται σε έναν τριφασικό φυγοκεντρικό διαχωριστήρα (decanter) όπου τα διαφορετικά μέρη (ελαιόλαδο, απόνερα, ελαιοπυρήνας) διαχωρίζονται με την επίδραση της φυγοκέντρου δύναμης. Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελούν οι σημαντικές ποσότητες νερού που απαιτούνται, οπότε και η αναπόφευκτη παραγωγή υψηλού όγκου ρυπογόνων υγρών αποβλήτων. Έχει υπολογιστεί ότι από 1000 kg καρπού, παράγονται 500 kg ελαιοπυρήνα (περιεκτικότητα σε υγρασία 50 %) και περίπου 1200 kg υγρών ρυπογόνων αποβλήτων.



Εικόνα 1.1: Τριφασικός διαχωριστής

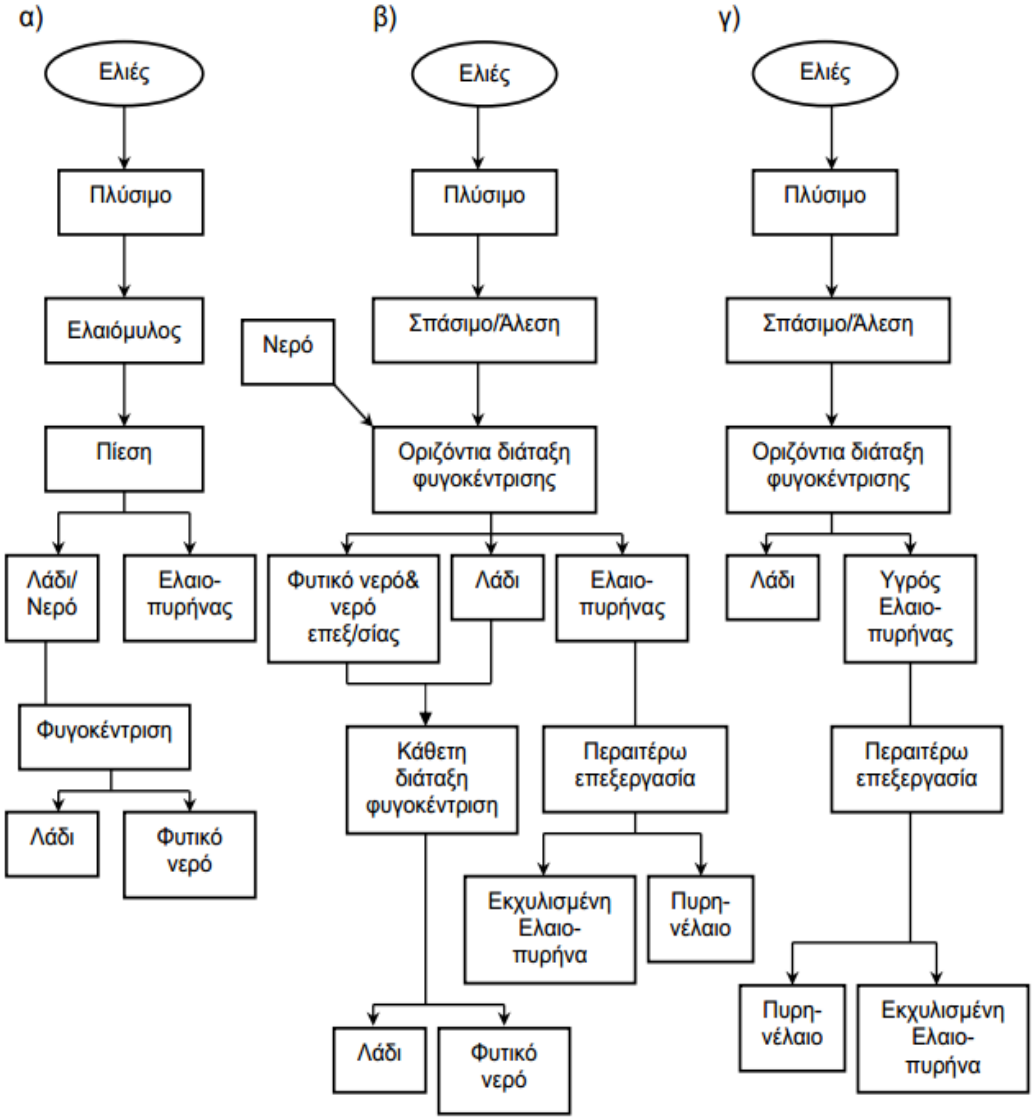
Στη διφασική διαδικασία παρατηρούμε υψηλότερες αποδόσεις συνολικά, της τάξεως του 86,1% (ποσοστιαία αναλογία του ελαιολάδου που παράγεται και στην ποσότητα του λαδιού που περιέχεται στις ελιές), υψηλότερες από τις αντίστοιχες ενός τριφασικού διαχωριστή (συμβατικός διαχωριστής με πρόσθεση νερού) όπου και ανέρχονται στο 85,5%. Αυτό οι αιτίες αυτής της διαφοράς μπορούν να αποδοθούν και στο γεγονός πως δεν υπάρχει προσθήκη νερού για αραίωση της ελαιοζύμης κι έτσι ο σχηματισμός γαλακτωμάτων λαδιού/νερού αποφεύγεται. Φαίνεται, επίσης, ότι αυτή η διαδικασία είναι ανώτερη σε ό,τι αφορά την ποιότητα του ελαιολάδου, καθώς αυτό έχει υψηλότερο συνολικό περιεχόμενο πολυφαινολών σε σχέση με το παραγόμενο από άλλες μεθόδους ελαιόλαδο, όντας σαφώς σταθερότερο κατά την αποθήκευση του.



Εικόνα 1.2: Διφασικός διαχωριστής

6. *<u>Καθαρισμός ελαιολάδου και τελική επεξεργασία του</u>*

Τα ανεπιθύμητα στερεά σωματίδια που βρίσκονται διαλυμένα στην υγρή φάση τελικώς διαχωρίζονται από εκείνην με τη χρήση παλινδρομικά κινούμενων κοσκίνων. Το βάρος αυτών των στερεών σωματιδίων υπολογίζεται σε ποσοστό έως και 1% επί του συνολικού βάρους της υγρής φάσης. Κατόπιν, με τη χρήση φυγοκεντρικών μεθόδων διαχωρισμού, παραλαμβάνουμε το επιθυμητό προϊόν, το ελαιόλαδο. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνονται οι διαφορές ανάμεσα στις προαναφερθέντες παραδοσιακές, τριφασικές και διφασικές μεθόδους.



Εικόνα 1.3: Διάγραμμα ροής της (α)παραδοσιακής, (β) τριφασικής και (γ) διφασικής μεθόδου παραγωγής ελαιολάδου

1.4. Ελαιουργικά Απόβλητα

Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων αποτελούν το σημαντικότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι ελαιουργικές περιοχές, λόγω της συνεχούς ύπαρξης τους και της παραπληροφόρησης σχετικά με αυτά. Ο κυριότεροι λόγοι του προβλήματος συνοψίζονται σε τρεις τομείς :

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

Τα ελαιουργικά απόβλητα χαρακτηρίζονται από:

- Έντονα ιώδες χρώμα
- Χαρακτηριστική μυρωδιά ελαιολάδου
- Υψηλό οργανικό φορτίο (τιμές COD μέχρι και 220g/l)
- pH 3 - 6
- Υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα
- Μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων (από 0,5 έως 24g/l)
- Υψηλή περιεκτικότητα σε στερεή ουσία (Μπλίκα, 2009)

Παράλληλα, τα απόβλητα, αναλόγως της φυσικής τους κατάστασης, διαχωρίζονται σε στερεά, αέρια και υγρά, όπως θα αναλυθούν και παρακάτω.

1.4.1. Στερεά Απόβλητα Ελαιοτριβείου

Ο ελαιοπυρήνας παράγεται σαν υποπροϊόν στα ελαιοτριβεία κατά την επεξεργασία του ελαιόκαρπου για την παραλαβή του ελαιολάδου. Η παραλαβή του ελαιολάδου, στην συντριπτική πλειοψηφία των ελαιοτριβείων, γίνεται με φυγοκέντριση σε φυγόκεντρους διαχωριστήρες δύο ή τριών φάσεων. Ο διφασικός διαχωριστήρας παράγει ελαιοπυρήνα υγρασίας 64-68%, ενώ ο τριφασικός ελαιοπυρήνα υγρασίας 48-54%. Και στις δύο περιπτώσεις ο ελαιοπυρήνας περιέχει ακόμη ελαιόλαδο της τάξης 8-12% (επί ξηρού) που δεν παραλήφθηκε από την φυγοκέντριση.

Στην συνέχεια ο ελαιοπυρήνας μεταφέρεται στα πυρηνελαιουργεία για να γίνει η παραλαβή του παραμένοντος ελαιολάδου (ακατέργαστο πυρηνέλαιο) με την μέθοδο της εκχύλισης.

Στα τμήματα ξήρανσης των πυρηνελαιουργείων γίνεται η ξήρανση του ελαιοπυρήνα ώστε η υγρασία του να φθάσει στο 8% - 10%. Η ξήρανση γίνεται σε ξηραντήρια, ερχόμενο σε άμεση επαφή με θερμό ρεύμα αέρα που παράγεται από την ανάμιξη των καυσαερίων μίας εστίας καύσης πυρηνόξυλου με αέρα του περιβάλλοντος.

Στη συνέχεια στα τμήματα εκχύλισης των πυρηνελαιουργείων γίνεται η εκχύλιση του ξηρού πια ελαιοπυρήνα για την απολαβή του πυρηνελαίου. Συνήθως χρησιμοποιείται ημισυνεχές σύστημα (στατικοί εκχυλιστήρες και συνεχές σύστημα απόσταξης) και για εκχυλιστικό υγρό (διαλύτης) χρησιμοποιείται καθαρό εξάνιο. Ο διαλύτης διοχετεύεται στους εκχυλιστήρες και το μίγμα πυρηνελαίου - διαλύτη που προκύπτει οδηγείται σε συνεχές αποστακτικό μέσο όπου και αποδίδεται ο διαλύτης υπό αέρια μορφή και το πυρηνέλαιο απαλλαγμένο από διαλύτη.

Μετά την απομάκρυνση του εξανίου – διαλύτη από τον εκχυλιστήρα, παραμένει μέσα σε αυτόν ο εκχυλισμένος ελαιοπυρήνας που απομακρύνεται με την βοήθεια ατμού υπό πίεση.

Ο ελαιοπυρήνας διφασικού ελαιοτριβείου αποτελεί ξεχωριστή κατηγορία καθώς δεν μπορεί να επεξεργαστεί από τα περισσότερα υπάρχοντα πυρηνελαιουργεία εξαιτίας της υψηλής σχετικής υγρασίας του, η οποία μπορεί να είναι πάνω από 65% λόγω των υγρών πλύσης που εμπεριέχονται από την εξαγωγή του ελαιολάδου.

Η παραγόμενη ποσότητα αντιστοιχεί σε 80 kg ανά 100 kg ελαιόκαρπου (Roig et al., 2006). Χαρακτηρίζεται από έντονα δυσάρεστη οσμή, σκούρο χρώμα και σχετικά όξινο pH. Κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω επεξεργασία του πριν τη διάθεση του στο περιβάλλον διότι παρουσιάζει υψηλό οργανικό φορτίο και είναι ιδιαίτερα τοξικό.

1.4.2. Αέρια Απόβλητα Ελαιοτριβείου

Τα μοναδικά αέρια που παράγονται κατά την παραγωγική διαδικασία των ελαιοτριβείων είναι τα καυσαέρια εσωτερικής καύσης, εκείνα της καύσης του ελαιοπυρήνα. Τα ελαιοτριβεία σε πολύ μεγάλο ποσοστό χωροθετούνται εκτός των αστικών περιοχών και έτσι δεν κινδυνεύουν κατοικημένες περιοχές από τους αέριους ρύπους που ενδεχομένως εκπέμπονται. Παράλληλα, οι ποσότητες των αέριων αποβλήτων είναι πολύ μικρές σε σχέση με τον μεγάλο όγκο του ατμοσφαιρικού αποδέκτη οπότε και η επιβάρυνση που επιφέρουν εκεί μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα. Έτσι, οδηγούμαστε στο τελικό συμπέρασμα ότι η επιβάρυνση της ατμόσφαιράς από τις αέριες εκπομπές των ελαιοτριβείων θεωρούνται αποδεκτά αμελητέες.

1.4.3. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου

Ως υγρά απόβλητα θεωρούνται τα φυτικά υγρά του ελαιοκάρπου, αυξημένα με το νερό κατεργασίας (πλύση ελαιοκάρπου, αραίωση ελαιοζύμης, πρόσθετο νερό διαχωριστήρων, καθαρισμός ελαιοτριβείου κλπ), τα οποία και προέρχονται από το στάδιο της έκθλιψης (εφόσον χρησιμοποιείται ως μέθοδος εξαγωγής ελαιόλαδου), το στάδιο του τελικού φυγοκεντρικού διαχωρισμού και το στάδιο της πλύσης του ελαιόκαρπου με καθαρό νερό. Τα απόβλητα είναι ιώδους χρώματος με χαρακτηριστική οσμή και σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλούς δείκτες ρύπανσης (BOD5, COD, αιωρούμενα στερεά).

Ο όγκος των αποβλήτων για τα μικρά ελαιοτριβεία υπολογίζεται σε 1 m^3/tn ελαιοκάρπου ή σε 5 m^3/tn ελαιόλαδου με πιθανή διακύμανση από 3-5,5 m^3/tn ελαιόλαδου (Economopoulos, 1993, Μαρκαντωνάτος, 1990). Το 16-20% των αποβλήτων προέρχεται από το στάδιο της πλύσης, το 76-80% από το στάδιο της έκθλιψης και διαχωρισμού και το 4% είναι υγρά απόβλητα απολάσπωσης από το στάδιο του τελικού διαχωρισμού.

Ουσιαστικά, λοιπόν, πρόκειται για ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, που περιέχει μία σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, πολυαλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα ελαίου. Η άμεση επίπτωση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου στο περιβάλλον είναι η αισθητική υποβάθμιση που προκαλεί και η οποία οφείλεται στην έντονη οσμή και στο σκούρο χρώμα τους. Παράλληλα, εξαιτίας του υψηλού οργανικού φορτίου που περιέχουν, είναι πιθανόν να δημιουργήσουν φαινόμενα ευτροφισμού σε περιπτώσεις που καταλήξουν σε αποδέκτες με μικρή επανακυκλοφορία νερών). Από τα συστατικά που περιέχονται, οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι από τη μία πλευρά προσδίδουν στα απόβλητα τοξικές ιδιότητες έναντι των φυτών και αποδομούνται

με βραδύ σχετικά ρυθμό από εξειδικευμένες ομάδες μικροοργανισμών, ενώ συγχρόνως είναι υπεύθυνες για τη συντήρηση της ποιότητας του λαδιού στο χρόνο (χαμηλή οξύτητα) ως φυσικό συντηρητικό. Ωστόσο, τα αναφερόμενα αυτά απόβλητα δεν περιέχουν άλλες ουσίες που να είναι ιδιαίτερα τοξικές, όπως βαρέα μέταλλα και λοιπές συνθετικές οργανικές ενώσεις.

	Vlyssides et al., 1996		Di Giovacchino & Mascolo, 1988	
Παράμετρος	**Πίεσης**	**3-φασικό**	**Πίεση**	**3-φασικό**
Ολικά στερεά, g/l	99,7	63,5	129.7	61.1
Ολικά αιωρούμενα στερεά,g/l	4,51	2,80		
Ολικά πτητικά στερεά, g/l	87,2	57,4		
Στάχτη, g/l	9,69	6,13	20	6.4
Ολικός οργανικός άνθρακας, g/l	64,1	39,8		
Ολικό άζωτο Kjeldahl, g/l	1,15	0,76		
Φώσφορος (P_2O_5), g/l	0,87	0,53		
pH	4,50	4,80	5.27	5.23
BOD_5, mg/l	68.700	45.500		
COD, mg/l	158.000	92.500	146.000	85.700
Ειδικό βάρος, g/cm^3	1,05	1,05	1.049	1.020
Αγωγιμότητα, mmhos/cm	18,0	12,0		
Ολικά σάκχαρα, g/l	25,9	16,1	35.8	15.9
Λίπη και έλαια, g/l	2,80	1,64	2.26	5.78
Πολυαλκοόλες, g/l	4,75	3,19		
Ολικές φαινόλες, g/l	17,2	10,6	6.2	2.7
Ταννίνες, g/l	6,74	4,01		
Κάλιο (K_2O), g/l	3,77	2,37	2,98	1,14
Νάτριο (Na_2O), mg/l	406	243	148	48.5
Ασβέστιο (CaO), mg/l	382	271	227	96,6
Σίδηρος (FeO), mg/l	48,3	32,0	42.3	18,0
Μαγνήσιο (MgO), mg/l	74,0	50,0	322	149
Πυρίτιο (SiO_2), mg/l	28,6	18,0		
Ολικό θείο, mg/l	101	63,0		
Χλώριο, mg/l	219	124		
Mn, mg/l	18,2	12,0	5.32	1.55
Zn, mg/l	19,7	12,0	3.57	2.06
Cu, mg/l	10,50	6,00	3.12	1.59

Πίνακας 1.4: Ενδεικτική Σύσταση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου

1.5. Διαχείριση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου

Τα ελαιουργικά απόβλητα κατατάσσονται στα πολύ τοξικά γεωργικά/βιομηχανικά απόβλητα λόγω του υψηλού ρυπαντικού τους φορτίου. Η διοχέτευση των αποβλήτων γίνεται σε διάφορους, υδάτινους κυρίως, αποδέκτες όπως τα ρεύματα, οι χείμαρροι, οι λίμνες, η θάλασσα αλλά και το έδαφος. Ενδεικτικά:

- το 58% των λυμάτων διοχετεύεται σε ρέματα, τα οποία συνήθως καταλήγουν σε υπόγεια ύδατα
- το 20% διοχετεύεται στο έδαφος
- το 12% διοχετεύεται στη θάλασσα και στα ποτάμια
- το 10% διοχετεύεται σε βυτία, δεξαμενές εξάτμισης και αλλού.

Η επεξεργασία και διάθεση των ελαιουργικών αποβλήτων είναι ένα από τα πιο δύσκολα προβλήματα και έχουν σχέση τόσο με την σύνθεση τους, όσο και με την τεχνολογική και οικονομική μορφή της ελαιουργικής βιομηχανίας. Πιο αναλυτικά, τα αίτια που συνθέτουν το πρόβλημα των αποβλήτων των ελαιουργείων εντοπίζονται:

- Στη μεγάλη διασπορά και το πλήθος των ελαιουργείων,
- Στον υψηλό όγκο των ελαιουργικών αποβλήτων
- Στην ύπαρξη υψηλού οργανικού φορτίου και κατά συνέπια στις αυξημένες τιμές των BOD5 (Biological Oxygen Demand) και COD (Chemical Oxygen Demand). Το BOD5 των ελαιουργικών αποβλήτων είναι περίπου 100 φορές μεγαλύτερο από το αντίστοιχο BOD5 των αστικών λημμάτων το οποίο κυμαίνεται από 300 – 400 mg/l
- Στον όξινο χαρακτήρα τους
- Στην υψηλή περιεκτικότητά σε ορισμένες χρωστικές (χλωροφύλλες, φαιοφυτίνες) και
- Στις τοξικές επιπτώσεις τους, τόσο στα φυτά όσο και στην υδρόβια πανίδα.

Εικόνα 1.4: Ενδεικτική μορφή ρύπανσης υδάτων από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου

1.6. Περιβαλλοντικές Επιπτώσεις Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου

Η απόρριψη ανεπεξέργαστων λυμάτων ελαιοτριβείου στα υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα μπορεί να οδηγήσει σε ταχεία αύξηση στον αριθμό των μικροοργανισμών, οι οποίοι απαιτούν και, ακολούθως, καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες οξυγόνου, μειώνοντας τη ποσότητα που είναι διαθέσιμη για τους άλλους ζώντες οργανισμούς του συστήματος και διαταράσσοντας την ισορροπία τους.

Ταυτόχρονα με τις υψηλές συγκεντρώσεις φωσφόρου στα λύματα ελαιοτριβείων και την απελευθέρωση του στα υδάτινα ρεύματα, η διαδικασία εναπόθεσης των λυμάτων μπορεί να επιταχύνει δραματικά την ανάπτυξη φυκών. Παράλληλα, οι καταστάσεις ευτροφισμού που προκαλούνται, δημιουργούν, τόσο στα υπόγεια όσο και στα επιφανειακά υδάτινα συστήματα, καταστάσεις ανισσοροπίας, έχοντας εμφανείς και σοβαρές συνέπειες στην τοπική υδάτινη ζωή, καθώς και στους ανθρώπους και την πανίδα που έρχονται σε επαφή με τα μολυσμένα ύδατα.

Έτσι, τα ελαιουργικά απόβλητα αποτελούν ένα σημαντικότατο παράγοντα επιμολύνσεως των γύρω ελαιουργικών περιοχών, με την αιτιολογία των λόγων να συνοψίζεται αναλυτικά στους παράγοντες που αναφέρονται παρακάτω.

- Η μεγάλη παραγωγή αποβλήτων μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, τα οποία αναγκαιεί να κατεργαστούν και να διατεθούν με ασφάλεια στο περιβάλλον πριν την επόμενη παραγωγική περίοδο. Αν και οι παραγόμενοι όγκοι αποβλήτων εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία του ελαιόκαρπου, το στάδιο ωριμότητας, ο χρόνος αποθήκευσης πριν την ελαιοποίηση, ο χρόνος διαχωρισμού του ελαιόλαδου από την ελαιοζύμη, το διαθέσιμο νερό στο ελαιοτριβείο και το κόστος προμήθειάς του, γενικότερα για κάθε 100 kg ελαιόκαρπου παράγονται 100-120 kg υγρών αποβλήτων, με μέση ημερήσια τιμή ανά ελαιουργείο τους 15 με 20 tn.

- Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αποβλήτων, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν σημαντική επιβάρυνση στους υδάτινους αποδέκτες, με σημαντικότερα προβλήματα τον ευτροφισμό, τις τοξικές ενδείξεις στην υδρόβια πανίδα, την φυτοτοξικότητα και την αισθητική υποβάθμιση των περιοχών.

- Το υψηλότατο οργανικό φορτίο σε άμεσα διασπώμενες ενώσεις όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα και πρωτεΐνες, αλλά και σε ενώσεις δύσκολα ή καθόλου διασπώμενες όπως οι διάφορες μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες και οι πολυφαινόλες. Σε ό,τι αφορά τις πολυφαινόλες, περιέχονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα απόβλητα και είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση βιοτοξικών φαινομένων στους φυσικούς αποδέκτες.

- Τα πολλά περιεχόμενα ανόργανα συστατικά (ενώσεις του αζώτου και του φωσφόρου, νάτριο, κάλιο, σίδηρο) που περιέχονται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στα ελαιουργικά απόβλητα. Αν και τα συστατικά αυτά δεν είναι τοξικά, η μεγάλη συγκέντρωσή τους και η επαναλαμβανόμενη διάθεσή τους μπορεί να προκαλέσουν σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα.

- Τα οξέα, οι ανόργανες και οι οργανικές ουσίες στα λύματα ελαιοτριβείων μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την κατιοανταλλακτική ικανότητα (CEC) των εδαφών. Η CEC χρησιμοποιείται ως μέσο μέτρησης της γονιμότητας του εδάφους και αναφέρεται στην ικανότητα κάποιου εδάφους να ανταλλάσσει κατιόντα (θετικά φορτισμένα ιόντα) μεταξύ του εδάφους και του διαλύματος εδάφους.

- Δυσάρεστες οσμές σε εκτεταμένη περιοχή δύναται να δημιουργηθούν λόγω της ζύμωσης των λυμάτων ελαιοτριβείων που διατίθενται στο φυσικό περιβάλλον, με την εκπομπή μεθανίου και άλλων δύσοσμων αερίων, όπως το υδρόθειο.

1.7 Μέθοδοι επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου

Για να επιτευχθεί η ασφαλής διάθεση των υγρών αποβλήτων ελαιουργίας στο περιβάλλον, θα πρέπει να επιλυθούν τρία βασικά προβλήματα. Καταρχάς, η αποδόμηση του υψηλού οργανικού φορτίου που διαθέτουν, το οποίο χρειάζεται μεγάλες ποσότητες οξυγόνου για να αποδομηθεί (με COD πολύ μεγαλύτερο ακόμη και από αυτό των αστικών λυμάτων). Ακολούθως, η αποδόμηση των υδατοδιαλυτών κατά βάση φαινολικών ενώσεων, τα οποία περιέχονται στα ελαιουργικά απόβλητα. Και τέλος, ζητήματα που αφορούν την εποχικότητα παραγωγής των αποβλήτων, σε χρόνο που αντιστοιχεί σε περίπου 3-4 μήνες ετησίως, με τις μεγάλες ποσότητες που παράγονται σε περιορισμένο χρονικό διάστημα να αυξάνουν και να καθιστούν μη βιώσιμο το κόστος αποθήκευσης και μεταφοράς τους. Συνεπώς, οι μέθοδοι επεξεργασίας των αποβλήτων οφείλουν να στοχεύουν στην επίλυση των ανωτέρω.

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος διαχείρισης των αποβλήτων ελαιοτριβείων έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι, πειραματικής κυρίως εφαρμογής για την ώρα. Είναι λογικό τα μεμονωμένα ελαιοτριβεία να μην μπορούν να επιλύσουν το πρόβλημα με τρόπο αποτελεσματικό και οποιαδήποτε ικανή μέθοδος απαιτεί συγκέντρωση μεγάλης ποσότητας αποβλήτων διαφόρων ελαιοτριβείων. Ακολούθως, παρουσιάζονται οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής για την αποτοξικοποίηση των αποβλήτων ελαιουργείου κι έχουν επιφέρει κάποια επαρκή αποτελεσματικότητα :

1.7.1. Φυσικοχημικές μέθοδοι

- **Προσθήκη ηλεκτρολυτών** : Γίνεται χρήση κροκκιδωτικών ($Ca(OH)_2$ και CaO) και προκύπτει καθίζηση μέρους του αποβλήτου, η οποία περιλαμβάνει αυξημένες ποσότητες ρυπογόνων συστατικών. Επιτυγχάνεται διάλυση και καθαρισμός των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου σε ποσοστό 60-70 %, ωστόσο η μείωση του οργανικού φορτίου που επιτυγχάνεται με αυτή είναι μικρή, της τάξης του 30-35%. Το απόβλητο αρχικά μεταφέρεται σε δεξαμενή και αφήνεται σε ηρεμία για 24-48 ώρες με σκοπό την καθίζηση των αιωρούμενων συστατικών. Έπειτα, η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε άλλη δεξαμενή όπου προστίθεται ασβέστης σε ποσότητα 5-10 g/l υγρών αποβλήτων ελαιουργίας. Η προσθήκη του ασβέστη εξουδετερώνει τα οξέα και αυξάνει τη τιμή του pH. Τα κατακρημνισμένα άλατα συμπαρασύρουν ποσοστό των διαλυμένων ή σε αραίωση οργανικών ουσιών και τελικά επιτυγχάνεται η μείωση του ρυπαντικού φορτίου και ο μερικός αποχρωματισμός του. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δημιουργία λάσπης σε ποσοστό 20% των αρχικών υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων η οποία λόγω του όγκου της και της δυσοσμίας που προσδίδει αποτελεί όχι απλά ένα μειονέκτημα αλλά ένα άλλο σοβαρό πρόβλημα. Συνεπώς αυτή η τεχνική αποτελεί πρωτοβάθμια επεξεργασία και είναι απαραίτητος ο συνδυασμός της με άλλες μεθόδους για να δώσει ικανοποιητικό βαθμό καθαρισμού των αποβλήτων.

Εικόνα 1.5: Δεξαμενή καθίζησης με ασβέστωση CaO

- **Αντιδραστήριο Fenton**: Η χημική οξείδωση του οργανικού φορτίου που προκαλείται μέσω της επεξεργασίας με το συγκεκριμένο αντιδραστήριο, επιτυγχάνεται μέσω των ριζών υδροξυλίου, οι οποίες σχηματίζονται από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ένα σιδηρούχο άλας (Fe^{+2}/H_2O_2) (Baldrian et al. 2006). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι δύσκολο να εφαρμοστεί για την αποδόμηση αποβλήτων υψηλού φαινολικού φορτίου εξαιτίας της ύπαρξης υδροξυ-ομάδων στον αρωματικό τους δακτύλιο , οι οποίες του προσδίδουν σταθερότερη του συνήθους δομή. Επιπλέον, η διάσπαση του οργανικού φορτίου προκαλεί και την παραγωγή τοξικών συστατικών, γεγονός ανεπιθύμητο, όπως άλλωστε και η δυσκολία καθορισμού βέλτιστων συνθηκών για την πραγματοποίηση της αντίδρασης Fenton.

- **Εξάτμιση**: Βασική επιδίωξη της μεθόδου είναι η εξάτμιση, μέσω της ηλιακής ενέργειας, του νερού που περιέχεται στο απόβλητο σε ποσοστό 94%. Η μέθοδος της φυσικής εξάτμισης σε δεξαμενές είναι γνωστή από παλαιότερα και έχει γενικευθεί στην Κρήτη και σε άλλες περιοχές με ξηροθερμικό κλίμα, όπου η εξάτμιση επιτυγχάνεται με ταχύτερους ρυθμούς.

  Βασική προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου είναι η ύπαρξη επαρκών εκτάσεων. Το βάθος των δεξαμενών δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1m, αλλιώς η διεργασία θα γίνει αναερόβια, γεγονός που θα προκαλέσει ακόμα πιο έντονη – κι ανεπιθύμητη – δυσοσμία. Η στεγανότητα είναι απαραίτητη ώστε να αποκλειστεί η μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα, ενώ ο επιφανειακός αερισμός μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση των δυσοσμιών.

  Κανονική επεξεργασία των αποβλήτων ελαιουργείων είναι πολύ δύσκολη λόγω του υψηλού BOD. Συνεπώς η μέθοδος της εξάτμισης αποτελεί πρωτοβάθμια επεξεργασία. Μόνο με μια σειρά από βιολογικούς αερόβιους καθαρισμούς μπορεί να μειωθεί το BOD των αποβλήτων τόσο ώστε να γίνεται δεκτό από τον υδατικό αποδέκτη, ωστόσο, το κόστος για κάτι τέτοιο θα ήταν απαγορευτικό για ευρείας κλίμακας επεξεργασία.

Εικόνα 1.6: Δεξαμενή εξάτμισης ελαιουργικών αποβλήτων

- **Προσρόφηση**: Μέθοδος με μικρή αποτελεσματικότητα και αναγκαιότητα εξειδικευμένου προσωπικού. Στηρίζεται στην προσθήκη ενεργού άνθρακα στην ποσότητα των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, προκαλώντας τον αποχρωματισμό αυτών. Αποτελέσματα ερευνών αναφέρουν ελαφριά αφαίρεση των χρωστικών ουσιών των υγρών αποβλήτων μετά από προσρόφηση ενεργού άνθρακα σε δόσεις μέχρι 10 gl^{-1} αποβλήτου (Shammas 1984).

- **Υπερδιήθηση – Αντίστροφη Ώσμωση**: Κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται πορώδεις μεμβράνες που διαχωρίζουν τις διαλυμένες ουσίες βάσει του μεγέθους τους, για την ανάκτηση χρήσιμων προϊόντων. Η ωθούσα δύναμη διαχωρισμού είναι η υδραυλική πίεση, η ίδια που εφαρμόζεται και στη μέθοδο αντίστροφης ώσμωσης. Η ημιπερατή μεμβράνη που χρησιμοποιείται στα συστήματα αντίστροφης ώσμωσης επιτρέπει τη δίοδο του νερού, ενώ είναι αδιαπέραστη από τα περισσότερα οργανικά και ανόργανα συστατικά των αποβλήτων. Οι μεμβράνες ώσμωσης χρησιμοποιούνται για τη συγκράτηση αμινοξέων, βιταμινών, απλών σακχάρων αλλά και ανόργανων συστατικών. Με μια από τις προαναφερθέντες μεθόδους μπορούν να παραληφθούν ανθοκυανίνες, φυσικές χρωστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ το συμπύκνωμα της υπερδιήθησης κατόπιν ειδικής ξηράνσεως έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή (Ισραηλίδης & Κωδούνης 1982). Ωστόσο αποτελούν μεθόδους υψηλού κόστους, τόσο ενεργειακά, όσο και από οικονομικής απόψεως.

- **Θερμική Συμπύκνωση**: Μέθοδος που κάνει χρήση ειδικών εξατμισοποιητών, διατάξεις με τις οποίες επιτυγχάνεται συμπύκνωση των αποβλήτων με τη μέθοδο της εξάτμισης. Η μείωση του όγκου των αποβλήτων έως και 75%, η επανάκτηση του ελαίου που περιέχεται στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου σε ποσοστό 0.1-0.3% και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του εξατμισμένου συμπυκνωμένου νερού αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου, η οποία, ωστόσο, υπολείπεται σε δημοφιλία λόγω του υψηλού της κόστους και της αναγκαιότητας επιπλέον διαχείρισης του στερεού υπολείμματος που παράγει (Μιχελάκης 2000).

- **Ηλεκτρολυτική οξείδωση**: Μέθοδος η οποία βασίζεται στην ηλεκτρολυτική οξείδωση των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου, κάνοντας χρήση ως κάθοδο ανοξείδωτο χάλυβα και ως άνοδο τιτάνιο (Ti) ή πλατίνα (Pt). Χρρησιμοποιείται κυρίως εργαστηριακά και σε περιορισμένη κλίμακα, παρά τα παραπάνω από ικανοποιητικά αποτελέσματα που επιδεικνύει (μείωση COD κατά 93%), εξαιτίας των υψηλότατων ενεργειακών απαιτήσεων της.

1.7.2. Συγκομποστοποίηση

Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο γίνεται συνεχής ή διακοπτόμενη αναπλήρωση αποβλήτων των εξατμιζόμενων ποσοτήτων νερού, κατά κύριο λόγο εξαιτίας της έκλυσης θερμότητας κατά τη θερμόφιλη φάση της αερόβιας χώνευσης των στερεών οργανικών υλικών. Το στερεό υπόστρωμα που υποβάλλεται στη ζύμωση, εφοδιάζεται με ποσότητα οργανικού υλικού που διατηρεί τη μικροβιακή δράση, διατηρώντας τη θερμοκρασία σε υψηλά επίπεδα κι επιταχύνοντας τη διαδικασία εξάτμισης του νερού που περιέχεται στα απόβλητα, καθώς επιμηκύνεται η θερμόφιλη φάση. Μετά την ολοκλήρωση, αυτό που προκύπτει είναι ένα ποιοτικό οργανοχουμικό λίπασμα, το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί σε φιαφορετικές καλλιέργειες φυτών, με αρκούντως ικανοποιητικά αποτελέσματα, ενώ και από άποψης ασφάλειας, η εφαρμογή των συγκεκριμένων κομπόστ είναι σαφώς ασφαλέστερη σε σύγκριση με αντίστοιχα κομπόστ από αστικά απορρίματα, μιας και παρουσιάζουν έλλειψη σε βαρέα μέταλλα, τοξικές οργανικές ενώσεις και παθογόνους οργανισμούς.

1.7.3. Αναερόβια ζύμωση με σκοπό την παραγωγή βιοαερίου

Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο επεξεργασίας επιδιώκεται η αποδόμηση των αποβλήτων υψηλού ρυπαντικού φορτίου (COD 5 – 40 g/L) και η βιο-μετατροπή των οργανικών τους ουσιών σε μεθάνιο. Πραγματοποιείται σε σύνθετους βιοαντιδραστήρες, απουσία οξυγόνου, όπου οι εν λόγω οργανικές ουσίες αποδομούνται και διασπώνται με την παρουσία μεθανογόνων βακτηρίων. Στα θετικά της μεθόδου συμπεριλαμβάνονται η συνεχής έκλυση βιοαερίου, το οποίο λόγω της σύστασης του (65% CH_4, 35% CO_2) είναι ενεργειακά αξιοποιήσιμο, όπως

και η παραγωγή επεξεργασμένης βιολογικής λάσπης, η οποία κατόπιν επεξεργασίας μπορεί να χρησιμεύσει ως λίπασμα.

1.7.4. Παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων υλικών

Ενδιαφέρουσα μεθοδολογία με χαμηλό κόστος, η οποία βασίζεται στη χρήση των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου με σκοπό την παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών. Πιο συγκεκριμένα, με χρήση μη κατεργασμένων Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου και στα υπολείμματα αυτών εντός δεξαμενών, μπορεί να επιτευχθεί η παραγωγή πολυ-β-υδροξυβουτυρικού οξέος (μέσω της ανάπτυξης του βακτηρίου azotobacter chroococcum εντός των αποβλήτων) και πολυσακχαριτών.

1.7.5. Ελεγχόμενη εναπόθεση σε εδαφικούς αποδέκτες

Αν και η αλόγιστη εισαγωγή των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου στο οικοσύστημα επιβαρύνει το περιβάλλον, προκαλώντας εκτεταμένη οικολογική καταστροφή, η ιδιαίτερη σύσταση τους (έχοντας υψηλό φαινολικό και λιπαρό φορτίο) δρα επιλεκτικά στους εδαφικούς μικροοργανισμούς, ευνοώντας την ανάπτυξη των στελεχών εκείνων που μπορούν να μεταβολίσουν τα συστατικά τους. Έτσι, υπό προϋποθέσεις, η εναπόθεση των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου μπορεί να συμβεί έχοντας έως κι ευεργετικές επιδράσεις στο έδαφος στο οποίο διατίθενται, λόγω των ποσοτήτων οργανικών ουσιών, καλίου, φωσφόρου και μαγνησίου που περιέχουν, αλλά και της απουσίας βαρέων μετάλλων ή άλλων ουσιών υψηλής επικινδυνότητας.

1.7.6. Αποδόμηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου με τη χρήση μικροοργανισμών (Βιολογική Επεξεργασία)

Η χρήση μικροοργανισμών ώστε να επιτευχθεί η βιοαποικοδόμηση των εν λόγω αποβλήτων στοχεύει στη μείωση του ρυπαντικού τους φορτίου, μέσω της αποδόμησης των φαινολικών τους ενώσεων, οι οποίες και παρουσιάζουν επίσχεση σε ό,τι αφορά τα βακτήρια και τους μύκητες του εδάφους στο οποίο εναποθέτονται, εμποδίζοντας την παραγωγή νέων προϊόντων. Η εισαγωγή των εν λόγω μικροοργανισμών πραγματοποιείται με τη μορφή εμβολίων, για τη δράση των οποίων οφείλεται να υπάρξουν ευνοϊκές συνθήκες που αφορούν τη θερμοκρασία, το pH και τον εξαερισμό. Τα βιολογικά συστήματα επεξεργασίας διακρίνονται σε αυτά που αφορούν αεροβική ή αναερόβια επεξεργασία, αναλόγως των στελεχών των μικροοργανισμών. Μια από τις βασικότερες ομάδες μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για τη μείωση της ρυπαντικής δράσης των φαινολών των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου είναι και οι Βασιδιομύκητες λευκής σήψης, στους οποίους θα γίνει αναλυτική αναφορά παρακάτω.

Κεφάλαιο 2: Λιγνινολυτικοί Μύκητες

2.1 Μακρομύκητες – Το γένος Pleurotus

Κάποια από τα πιο ευρέως διαδεδομένα καλλιεργούμενα εδώδιμα μανιτάρια, τα οποία λόγω και του σχήματος που πίλου τους αποκαλούνται και οστρακοειδή μανιτάρια (oyster mushrooms), περιλαμβάνουν και την εν λόγω κατηγορία που μας ενδιαφέρει, το γένος Pleurotus. Η παρούσα κατηγορία ανήκει στο φύλο των Βασιδιομυκήτων, ενώ η εξάπλωση τους είναι ευρεία και σε παγκόσμια κλίμακα, λόγω της ικανότητας τους να μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 15 έως και 31 ^{o}C. Ταυτόχρονα, το γεγονός της αποίκησης τους σε ένα μεγάλο εύρος λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων, τα οποία περιλαμβάνουν απόβλητα βαμβακιού, πριονίδι, χαρτί, δασικά υπολείμματα, άχυρα και άλλα τα κάνει άμεσα ευπροσάρμοστα και ικανά να επιβιώσουν σε ενα αρκούντως ικανό εύρος συνθηκών. Η συγκεκριμένη κατηγορία που μας ενδιαφέρει εδώ, εκείνη των βασιδιομυκητών του γένους Pleurotus, ανήκουν στους μήκυτες λευκής σήψης, οι οποίοι είναι νηματοειδείς μήκυτες που ζουν και αναπτύσσονται πάνω σε οργανική ύλη σε κατάσταση αποσύνθεσης. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι η αποικοδόμηση της λιγνίνης, της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης, συστατικά του ξύλου. Η ονομασία τους προέρχεται από το λευκό, ινώδες υπόλειμμα που αφήνεται στην αποσυνθεμένη οργανική ύλη μετά τη δράση τους, ενώ η αποδόμηση της λιγνίνης από τους μύκητες λευκής σήψης μπορεί να πραγματοποιηθεί επιλεκτικά ή μη επιλεκτικά. Επίσης, χαρακτηριστικό τους είναι το χρώμα τους, το οποίο εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης του καρποσώματος τους και το οποίο ποικιλεί από λευκό, υπόλευκο, καφέ, μπλε ή γκρι.

Σε ό,τι αφορά την διάκριση μεταξύ επιλεκτικής και μη επιλεκτικής αποδόμησης, κατά την πρώτη η λιγνίνη και ημικυτταρίνη αποδομούνται περισσότερο από την κυτταρίνη, ενώ στη δεύτερη αποδομούνται σε ίσες ποσότητες. Επίσης, μια ακόμη διάκριση είναι πως η επιλεκτική αποσύνθεση της λιγνίνης, συμβαίνει στην αρχή της αποσύνθεσης, ακολουθούμενη από την αποικοδόμηση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός πως ορισμένοι μύκητες, όπως οι Ganoderma Applanatum, Phellinus Pini και Heterobasidion Annosum παρουσιάζουν ικανότητα να πραγματοποιήσουν και τους δύο προαναφερθέντες τύπους αποσύνθεσης. Η μυκητιακή προσβολή, έτσι κι αλλιώς, αποτελεί μια μη εξειδικευμένη, οξειδωτική διεργασία, κατά την οποία πραγματοποιείται διάσπαση των αρωματικών δακτυλίων, δημιουργία νέων καρβοξυλικών ενώσεων και μείωση των φαινολικών και αλειφατικών ομάδων της λιγνίνης, οδηγώντας στον απο-πολυμερισμό της και την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα.

Τα μανιτάρια του γένους Pleurotus αποτελούν εδώ και χρόνια μια χρησιμοποιούμενη πηγή τροφής με ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου. Σε αυτό συντελεί και η σύταση του καρποσώματος των εν λόγω βασιδιομυκήτων, καθώς αποτελούνται από υγρασία σε ποσοστό άνω του 85%, ενώ η υψηλή τους περιεκτικότητα σε πρωτεϊνη τα κατατάσει στις τροφές με υψηλή διατροφική αξία, πόσο δε μάλλον συγκριτικά με τα περισσότερα λαχανικά και δημητριακά, αποτελώντας μια αρκούντως ικανοποιητική πηγή απαραίτητων αμινιξέων.

Συγχρόνως, οι βασιδιομύκητες του γένους Pleurotus παρουσιάζουν πλούτο σε απαραίτητα λιπαρά οξέα (0,2 – 8 % επί ξηρού), υδατάνθρακες (σε μορφή πολυσακχαρίτων ή γλυκοπρωτεϊνών) και διαιτητικές ίνες, με το ποσοστό να φιαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ειδών, αλλά και μακροθρεπτικά στοιχεία όπως ο φώσφορος, το νάτριο και το κάλιο και ιχνοστοιχεία όπως ο σίδηρος και ο ψευδάργυρος.

Σε ό,τι αφορά τις φαρμακευτικές ιδιότητες των μανιταριών Pleurotus, άξια αναφοράς είναι η αντικαρκινική και αντιχοληστεριναιμική τους δράση, η αντιδιαβητική, η αντιγηραντική και ηπατοπροστατευτική, η αντιοξειδωτική αλλά και η αντιμικροβιακή τους δράση, οι οποίες κι έχουν διαπιστωθεί σε διάφοτα παρασκευάσματα των εν λόγω μυκητών. Παρόλο, λοιπόν, που ο ακριβής μηχανισμός που επιτυγχάνονται τα παραπάνω δεν είναι ακόμη γνωστός, μια σειρά μορίων έχει απομονωθεί και αντιστοιχηθεί ως τα υπαίτια για ορισμένες από τις προαναφερθείσες δράσεις/ιδιότητες, με τις σημαντικότερες να είναι οι εξής:

- *Πλευράνη*: πολυσακχαριτικό μόριο που ανήκει στην κατηγορία των γλυκανών κι εμφανίζει αντικαρκινική δράση, εμποδίζοντας την ανάπτυξη όγκων, όπως και ανοσοκατασταλτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Bobek and Galbavy, 2001).
- *Λοβοστατίνη*: ανήκει στα πολυκετίδια, λειτουργώντας ως αναστολέας της αναγωγάσης του 3-υδροξυ-μέθυλο-γλουταρυλυκού συνενζύμου, το οποίο είναι απαραίτητο για τη βιο-σύνθεση της χοληστερόλης.
- *Πλευροστρίνη*: πεπτίδιο 7kDa με αντιμυκητιακή δράση έναντι μυκητών όπως το Fusarium Oxysporum και άλλων.
- *Ερυνγκίνη*: πεπτίδιο 10 kDa, με επίσης έντονη αντιμυκητιακή δράση.

2.2 Το γένος Irpex

Το συγκεκριμένο γένος μηκυτών αναπτύσσεται συνήθως σαν κρούστα πάνω σε κορμούς δέντρων και σε νεκρή φυτική ύλη (συνήθως ξυλώδη), προκαλώντας την αποικοδόμηση τους και παρουσιάζοντας λευκή σήψη. Τα βασιδιοκάρπια τους έχουν βελούδινη ή τριχωτή υφή, παρουσιάζουν υπόλευκο χρώμα και υψώνονται της επιφάνειας του μυκηλίου έως και 6mm. Λόγω κλιματικών συνθηκών, συνήθως

απαντάται στην ευρωπαϊκή ήπειρο, την Βόρεια Αμερική και σε άλλες περιοχές εντός της εύκρατης ζώνης. Όπως και η προαναφερθείσα κατηγορία (Pleurotus), έτσι κι αυτά ανήκουν στους μύκητες λευκής σήψης, ανήκοντας στην τάξη των Polyporales, την οικογένεια Meruliaceae και το γένος Irpex.

Πιο μελετημένος εκπρόωπος του συγκεκριμένου γένους είναι τα μανιτάρια Irpex Lacteus, παρουσιάζοντας μεγάλη βιοτεχνολογική σημασία, μιας και μπορούν να αποικοδομούν ιδιαίτερα αποτελεσματικά τη λιγνινοκυτταρίνη, διαθέτοντας συγχρόνως πολύ ισχυρά οξειδωτικά ένζυμα. Μάλιστα, ο μύκητας Irpex Lacteus έχει τη δυνατότητα να παράγει μεταβολίτες με έντονα τοξική δράση έναντι των νηματωδών σκωλήκων.

Εξετάζοντας τις ενζυμικές δυνατότητες του εν λόγω μύκητα, από το στέλεχος έχουν απομονωθεί ποικίλων ειδών ένζυμα, τα οποία παρουσιάζουν δράσεις ένδοκυτταρινάσης και έξωκυτταρινάσης, ενδο-β-ξυλοζιδάσης, ξυλανάσες, μια πρωτεϊνάση που ομοιάζει με την πεψίνη και άλλα. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, όμως, το παρουσιάζουν τα οξειδωτικά ένζυμα του Irpex Lacteus, στα οποία και οφείλεται η λιγνινοκυτταρική του δράση, καθώς ο μύκητας αυτός παράγει λακκάσες και υπεροξειδάσες εξαρτημένες και ανεξάρτητες από το μαγγάνιο για την αποδόμηση της λιγνίνης, αλλά και άλλα οξειδωτικά ένζυμα, όπως μια ειδική υπεροξειδάση (Shin 2004) και μια υπεροξειδάση αποικοδόμησης βαφών (Salvachua et al. 2014).

Εκτός των άλλων εφαρμογών στις οποίες έχει δοκιμαστεί επιτυχώς, μεταξύ των οποίων ένα σημαντικό κομμάτι αφορά την αποικοδόμηση συνθετικών βαφών, αλλά και τη βιοεξυγίανση και αποικοδόμηση ρυπαντών όπως PAHs και ορμονών, ο Irpex Lacteus έχει εξεταστεί και σε απόβλητα της διεργασίας ξεπικρίσματος της ελιάς (Aggelis et al., 2002). Μέσω αυτής της μελέτης, αποκαλύφθηκε πως η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από τον εν λόγω μύκητα οφείλεται στη δράση υπεροξειδασών καταρχάς, και σε πολύ πιο μικρό βαθμό, λακκάσης. Τέλος, προσπάθειες έχουν γίνει ώστε λιγνινοκυτταρινούχα απόβλητα να προκατεργασθούν χρησιμοποιώντας τις δράσεις του Irpex Lacteus, με σκοπό την παραγωγή βιοκαυσίμων, μια προκατεργασία όπου η πολύπλοκη δομή της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης αποδομούνται μερικώς, ώστε το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα να διασπασθεί, επιτρέποντας στο στάσιο της ενζυμικής υδρόλυσης τα ένζυμα να έρθουν σε επαφή με τις ίνες της κυτταρίνης προκειμένου να συμβεί η διάσπαση τους για να παραχθεί ζυμώσιμη γλυκόζη.

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

Πίνακας 2.1: Σύνηθη καλλιεργούμενα εδώδιμα μανιτάρια – λιγνινολυτικές τους ιδιότητες

2.3 Λιγνινοκυτταρίνη

Η λιγνινοκυτταρίνη αποτελεί παράγωγο της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης, όντας ένα πολυμερές που βρίσκεται περίπου στη μισή από την ύλη που παράγεται κατά την ανωτέρω διαδικασία. Τρία είναι τα είδη των πολυμερών που την αποτελούν, καθώς κατά μέσο όρο η λιγνινοκυτταρίνη αποτελείται από 45% κυτταρίνη, 30% ημικυτταρίνες και 25% λιγνίνη.

- Το πιο απλό δομικά από τα παραπάνω συστατικά είναι η κυτταρίνη, όντας και μια από τις πιο διαδεδομένες οργανικές ενώσεις στη φύση. Αποτελεί ένα πολυμερές από μονάδες γλυκόζης ενωμένες μεταξύ τους με (1,4)-β-D-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Κατά την υδρόλυση της καταφέρνεται σχηματισμός του δισακχαρίτη κελλοβιόζη. Διακρίνεται σε ινώδη κυτταρίνη, η οποία

αποτελεί το άκαμπτο τμήμα των φυτικών ιστών και σε άμορφη κυτταρίνη που αποτελείται από πιο αποδιοργανωμένα τμήματα και βρίσκεται σρο εύκαμπτο τμήμα των φυτικών ιστών.

- Μικρές αλυσίδες ετερογενών πολυμερών είναι που σχηματίζουν τις ημικυτταρίνες, οι οποίες περιέχουν εξόζες (όπως λακτόζη, γλυκόζη ή μαννόζη) και πεντόζες (όπως ξυλόζη και αραβινόζη). Διακρίνονται σε τρεις βασικούς τύπους, τις ξυλάνες, το γλυκουτονικό και αραβινογλυκουρονικό οξύ και τις μαννάνες. Είναι άμορφη και η υδρολυτική της διάσπαση επιτυγχάνεται ευκολότερα.
- Η λιγνίνη είναι ένα πολυμερές που εμφανίζει τρισδιάστατο, ακανόνιστο σχήμα και υψηλό μοριακό βάρος (>10000), αποτελούμενο από υπομονάδες φαινυλοπροπανίου. Δεν υδρολύεται εύκολα, είτε χημικά, είτε ενζυμικά. Είναι υπεύθυνη για τη φυτική ακαμψία και την ανθεκτικότητα τους σε μηχανικές καταπονήσεις και μικροβιακούς κινδύνους (Taoukis et al., 2009). Δομικά δεν είναι απολύτως γνωστή, καθώς είναι ιδιαίτερα δύσκολη η εκχύλιση της λόγω της ομοιοπολικής της σύνδεσης με την κυτταρίνη και άλλους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος. Οι βασικές της μονάδες κονυφερυλική, συναπυλική και π-κουμαρυλική αλκοόλη) συνδέονται μεταξύ τους με ανθρακικούς δεσμούς, δημιουργώντας ένα αρκετά σύνθετο και πολύπλοκο μεγαλομόριο. Σε αυτή τη δομή οφείλεται και η ανθεκτικότητα της, μπορώντας να φέρει αντίσταση στη προσβολή από μικρόβια και μικροοργανισμούς και την αποικοδόμηση του ξύλου.

2.4 Λιγνινοκυτταρικά ένζυμα

Οι προαναφερθέντες βασιδιομύκητες, οι ισχυρότεροι αποικοδομητές της λιγνινοκυτταρίνης, έχουν δύο ειδών εξωκυτταρικών ενζυμικών συστημάτων:

- Ένα υδρολυτικό σύστημα, όπου και παράγουν υδρολάσες για την αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών
- Ένα οξειδωτικό σύστημα, όπου κι επιτυγχάνεται η αποικοδόμηση της λιγνίνης και διανοίγονται οι φαινολικοί δακτύλιοι.

Τα ένζυμα που παράγονται από τους μύκητες λευκής σήψης αναφέρονται συνηθέστερα ως λιγνινάσες, οι οποίες διαχωρίζονται στις

- Φαινολικές οξειδάσες, όπως η λακκάση (Lac)
- Υπεροξειδάσες, όπως η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP)

Ένζυμο	Συνένζυμο	Υπόστρωμα	Επίδραση ή αντίδραση
Υπεροξειδάση της λιγνίνης, LiP	H_2O_2	Βερατρυλική αλκοόλη	Αρωματικός δακτύλιος οξειδώνεται στην αντίστοιχη κατιοντική ρίζα
Υπεροξειδάση του μαγγανίου, MnP	H_2O_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_2O_2	Παρόμοιες ενώσεις με την LiP και MnP	Ίδια επίδραση με την LiP και MnP
Λακκάση, Lac	O_2	Φαινόλες, διαβιβαστές (mediators) π.χ. υδροξυβενζοτριαζόλη, ABTS	Φαινόλες οξειδώνονται σε φαινοξυλικές ρίζες
Οξειδάση της γλυοξάλης, GLOX	O_2	Γλυοξάλη, μεθυλική γλυοξάλη	Γλυοξάλη οξειδώνεται σε γλυοξυλικό οξύ, παραγωγή H_2O_2
Οξειδάση της αρυλικής αλκοόλης, AAO	O_2	Αρωματικές αλκοόλες (ανισυλική, βερατρυλική αλκοόλη)	O_2 ανάγεται σε H_2O_2
Αφυδρογονάση της κελλοβιόζης (Cellobiose: quinone 1-oxidoreductase, CBQ)		Κελλοβιόζη	Αναγωγή των ο- και p-κινονών

Πίνακας 2.2: Εξωκυτταρικά λιγνινολυτικά ένζυμα που έχουν συμμετοχή στην αποικοδόμηση της λιγνίνης

2.4.1 Λακκάση

Ως Λακκάση ορίζεται μια πολυφαινολική οξειδάση, η οποία και ανήκει στην ομάδα ενζύμων των μπλε οξειδασών. Στα συγκεκριμένα ένζυμα βρίσκουμε χαλκό στο ενεργό τους κέντρο, ενώ ανήκουν στην κατηγορία των γλυκοπρωτεϊνών. Για πρώτη φορά απομονώθηκαν από το δέντρο Rhus vernicifera, ένα δέντρο ιαπωνικής προέλευσης από το οποίο παράγεται η λάκα, ενώ κάποια χρόνια αργότερα βρέθηκε πως υπάρχει και στους μύκητες. Πολλές φορές αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως multicopper oxidases, λόγω της προαναφερθείσας ύπαρξης χαλκού στο κέντρο τους, ενώ έχει βρεθεί πως καταλύουν την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό, η οποία και ακολουθείται από οξείδωση του υποστρώματος, το οποίο είναι συνήθως κάποιο φαινολικό μόριο.

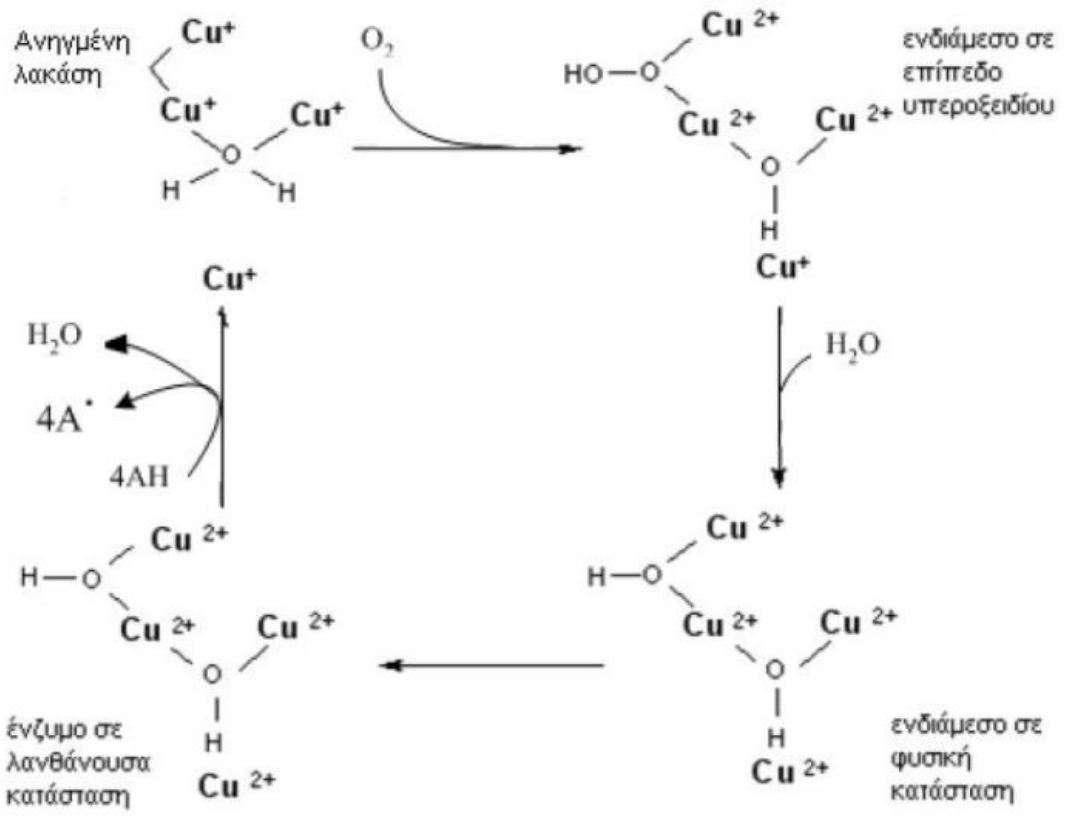
Τα συγκεκριμένα ένζυμα περιέχουν ποικίλους τύπους ενεργών κέντρων χαλκού, διακριτά μέσα από τις φασματοσκοπικές τους ιδιότητες. Πιο αναλυτικά, το κέντρο χαλκού τύπου 1 είναι μονοπυρηνικό και χαρακτηρίζεται από υψηλή απορρόφηση στο ορατό φάσμα (λ_{max} ~ 600nm), γεγονός στο οποίο οφείλεται το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα των ενζύμων με τέτοιο κέντρο χαλκού. Επίσης, διαφέρει από το κέντρο χαλκού τύπου 2 σε ό,τι έχει να κάνει με τη λειτουργία τους, καθώς έχουν ως προτεραιότητα την μεταφορά ηλεκτρονίων, σε αντίθεση με το κέντρο τύπου 2 που έχει την κατάλυση. Σε ό,τι αφορά τα κέντρα χαλκού τύπου 3, διακρίνονται για τα δύο στενά, οριοθετημένα άτομα χαλκού και έχουν χρήση στην κατάλυση, ειδικά στην δέσμευση κι ενεργοποίηση του O_2. Ο καταλυτικός κύκλος της λακκάσης διακρίνεται για την ελεγχόμενη ροή ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα στην τριάδα κατάλυσης και στο οξυγόνο, διαμέσω του κέντρου χαλκού τύπου 1.

Παράλληλα, οι λακκάσες διακρίνονται από υψηλά οξειδωτικά δυναμικά (E_o), με τιμές που ξεκινούν από τα 450-480 mV για τη λακκάση του M. Thermophila και φτάνουν μέχρι τα 760-790 mV για εκείνη του Polyporus pinsitus. Η χρήση τους βρίσκεται στην οξείδωση ενός ηλεκτρονίου ενός υποστρώματος, συγχρόνως με την αναγωγή τεσσάρων ηλεκτρονίων από το οξυγόνο στο μόριο του νερού. Το ηλεκτρόνιο που απομκρύνεται οδηγεί στο σχηματισμό μιας ελεύθερης οργανικής ρίζας, ενός γενικά ασταθούς τύπου που οδηγεί σε περαιτέρω αντιδράσεις, αυθόρμητες ή ενζυμικά καταλυόμενες.

Οι πιο συνηθισμένες μυκητιακές λακκάσες είναι πρωτεϊνες μεγέθους 60-70 kDa με όξινα ισοηλεκτρικά σημεία γύρω στο pH 4. Στις λακκάσες των ασκομυκήτων, όμως, υπάρχει σημαντική ετερογένεια σε ό,τι αφορά το μοριακό τους βάρος. Μάλιστα, η μοριακή βάση της ύπαρξης ισοενζύμων λακκάσης που διαφέρουν αισθητά μεταξύ τους οφείλεται στο γονιδίωμα τους, στο οποίο απαντώνται πολλαπλά γονίδια λακκασών.

Τα υποστρώματα των λακκασών δεν είναι προσβάσιμα υπό κανονικές συνθήκες, μην μπορούντας να οξειδωθούν από το ένζυμο, με τη δράση της λακκάσης να συμβαίνει μέσω των οξειδοαναγωγικών μεσολαβητών ή των ενδιάμεσων προϊόντων. Η συγκεκριμένη διαπίστωση συνέβαλε τα μέγιστα στην in vitro αποδόμηση της λιγνίνης με το συδυασμό λακκάσης και ABTS, παρουσιάζοντας τον εξέχοντα ρόλο του ενζύμου στα συστήματα μυκητών με την παρουσία ενός ισοδυνάμου του ABTS. Ταυτοχρόνως, οι μυκητιακές λακκάσες έχουν βέλτιστες τιμές δράσης σε όξινα pH, με τα βέλτιστα pH για την οξείδωση του ABTS να είναι κάτω του 4, ενώ για ενώς όπως η συρινγκαλδαζίνη και η γουαϊακόλη κυμαίνονται από 4 έως 7. Θερμοκρασιακά και σε ό,τι αφορά τη δράση τους, οι λακκάσες δεν αποκλίνουν ιδιαίτερα από τα διάφορα εξωκυτταρικά λιγνινολυτικά ένζυμα με βέλτιστες τιμές που κυμαίνονται από 50 έως 70°C, έστω κι αν υπάρχουν εξαιρέσεις

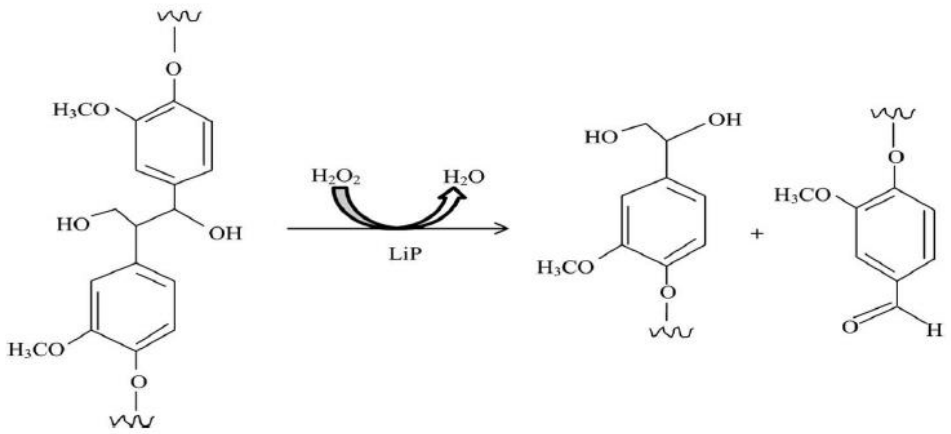
σε αυτόν τον κανόνα (όπως η λακκάση του G. Lucidum, με βέλτιστη θερμοκρασία τους 25°C).



Εικόνα 2.1: Ο κύκλος κατάλυσης της λακκάσης

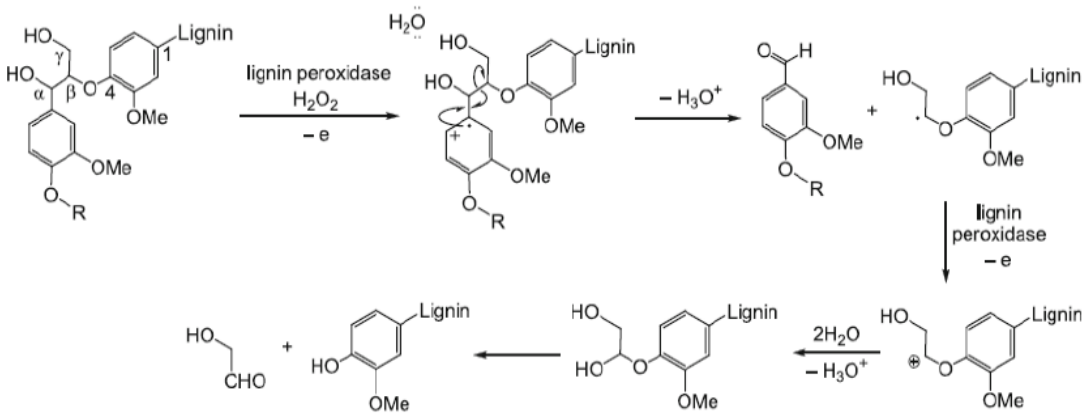
2.4.2 Υπεροξειδάση της λιγνίνης

Οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiPs) αποτελούν εξωκυτταρικές γλυκοπρωτεϊνες μοριακού βάρους περί τα 40 kDa, οι οποίες διαθέτουν υψηλό οξειδωτικό δυναμικό, μπορώντας να οξειδώσουν τις μη φαινολικές δομές της λιγνίνης. Συχρόνως, οι συγκεκριμένες ενώσεις γιακρίνονται για την ικανότητα οξείδωσης ενός ευρέος φάσματος αρωματικών ενώσεων, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της λιγνίνης, αλλά και την οξείδωση ποικίλων φαινολικών ενώσεων. Η γλυκοπρωτεϊνη που μας ενδιαφέρει εδώ, η υπεροξειδάση της λιγνίνης, αποτελεί μια αιμοπρωτεϊνη που καταλύει την οξειδωτική αποικοδόμηση της λιγνίνης, εξαρτώμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου.



Εικόνα 2.2: Οξειδωτική διάσπαση δεσμών λιγνίνης από την LiP

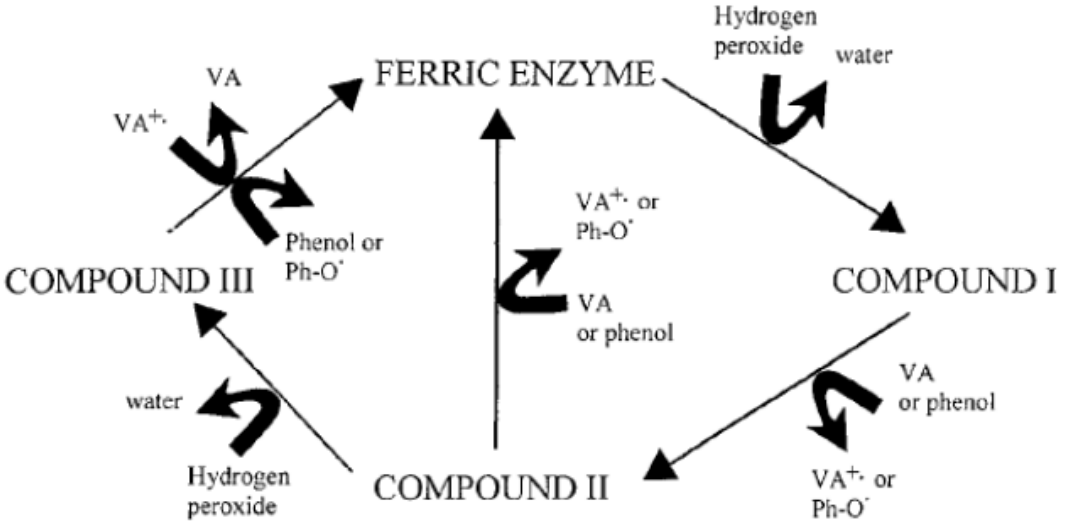
Σε πρώτο χρόνο, η υπεροξειδάση της λιγνίνης βρέθηκε στο μύκητα Phanerochaete chrysosporium και είναι χαρακτηριστική ανάμεσα στους μύκητες λευκής σήψης, ενώ έχει απομονωθεί και σε καλλιέργειες μυκητών καστανόχρωμης σήψης. Σε ό,τι αφορά την αποδόμηση της λιγνίνης, υπάρχει μια ακολουθία καταλυόμενων αντιδράσεων που φανερώνουν τη σπουδαιότητα της υπεροξειδάσης της λιγνίνης στη συγκεκριμένη διαδικασία. Ξεκινώντας με τη διάσπαση του δεσμού Cα-Cβ σε β-O-4 αρυλαιθερικές ενώσεις, ακολουθεί η οξείδωση του Cα των προαναφερθέντων ενώσεων στις αντίστοιχες κετόνες, η οξειδωτική σχάση του αρωματικού δακτυλίου μεταξύ C_3-C_4 και η απομεθυλίωση και υδροξυλίωση των βενζολικών μεθυλενομάδων.



Εικόνα 2.3: Καταλυόμενες αντιδράσεις από την LiP

Ο καταλυτικός κύκλος της υπεροξειδάσης της λιγνίνης αποτελείται από τρία στάδια. Καταρχάς, συμβαίνει η οξείδωση του σιδήρου III της αίμης του ενζύμου από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, κάτι που έχει ως επακόλουθο το σχηματισμό ενός οξο-φερυλ-ενδιάμεσου (Ένωση 1). Δευτερευόντως, το ενδιάμεσο αυτό ανάγεται από ένα μόριο υποστρώματος, το οποίο δίνει ένα ηλεκτρόνιο στην Ένωση 1, για να σχηματιστεί η Ένωση 2, το δεύτερο, δηλαδή, ενδιάμεσο. Στο τρίτο και τελευταίο

στάδιο, ένα ακόμη ηλεκτρόνιο προσλαμβάνεται από το ανηγμένο υπόστρωμα, προκειμένου να επανέλθει το ένζυμο στην αρχική του κατάσταση και να ολοκληρωθεί ο οξειδωτικός κύκλος.



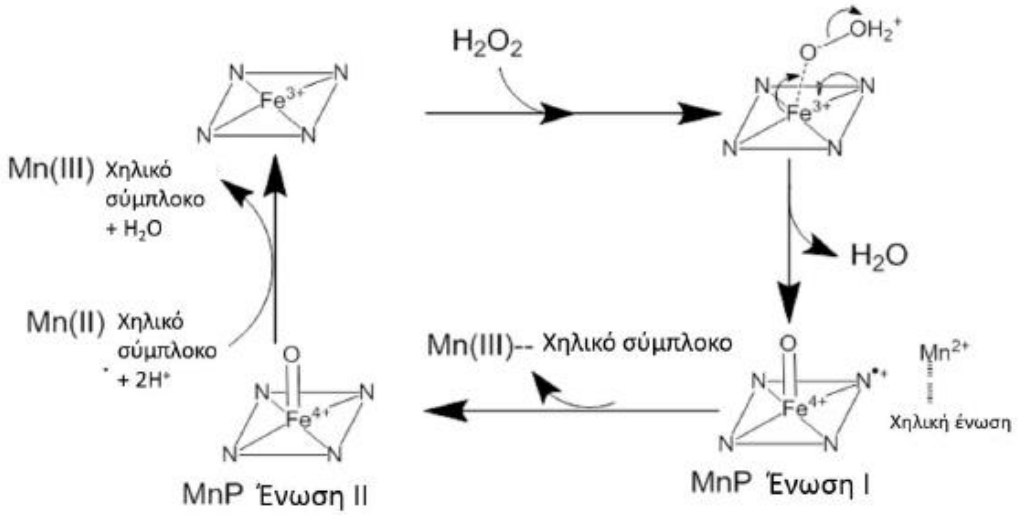
Εικόνα 2.4: Ο καταλυτικός κύκλος της LiP

2.4.3. Υπεροξειδάση του Μαγγανίου

Η υπεροξειδάση του Μαγγανίου (MnP) είναι μια πρωτεϊνη που περιέχει αίμη και χρησιμοποιεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου για να οξειδώσει το κατιόν του Μαγγανίου (Mn^{2+}) σε ένα χηλικό σύμπλοκο του ιόντος Mn^{3+}). Για την ώρα, η παραγωγή υπεροξειδάσης του Μαγγανίου έχει βρεθεί μονάχα σε βασιδιομύκητες λευκής σήψης, οι οποίοι συνήθως είναι ικανοί να παράγουν πολλαπλά ισοένζυμα με ενεργότητα MnP. Οι συγκεκριμένες ισομορφές διαφέρουν κυρίως στα ισοηλεκτρικά τους σημεία, τα οποία είναι όξινα και κυμαίνονται σε τιμές pH από 3 έως 4, παρόλο που υπάρχουν εξαιρέσεις με λιγότερο όξινα έως και ουδέτερα ισοηλεκτρικά σημεία. Τα μοριακά βάρη των υπεροξειδάσων του Μαγγανίου παίρνουν τιμές μεταξύ 38 και 62 kDa, με τα περισσότερα, ωστόσο, ένζυμα να εμφανίζουν μοριακό βάρος στα 45 kDa.

Σε ό,τι έχει να κάνει με το καταλυτικό κύκλο των υπεροξειδάσων του Μαγγανίου, ομοιάζει αρκετά με εκείνον των υπολοίπων υπεροξειδασών αίμης, αλλά εν αντιθέσει με εκείνες περιλαμβάνει το κατιόν Μαγγανίου Mn^{2+}, το οποίο διαδραματίζει το ρόλο του υποστρώματος. Σε πρώτο χρόνο, το H_2O_2 ή ένα οραγνικό υπεροξείδιο προσδένεται στο ένζυμο και δημιουργείται έτσι ένα σύμπλοκο υπεροξειδίου-σιδήρου. Το να διασπαστεί ο δεσμός οξυγόνου-οξυγόνου του υπεροξειδίου απαιτεί να μεταφερθούν δύο ηλεκτρόνια από την αίμη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συμπλόκου Fe^{4+}-οξο-πορφυρινικής ρίζας. Ακολούθως, συμβαίνει διάσπαση του δεσμού οξυγόνου-οξυγόνου και

απελευθερώνεται ένα μόριο νερού. Η αναγωγή συμβαίνει μέσω ενός συμπλόκου Fe^{4+}-οξο-πορφυρίνης, ενώ ένα ιόν Mn^{2+} το οποίο οξειδώνεται σε Mn^{3+}, έχει την ιδιότητα του δότη ηλεκτρονίων για το συγκεκριμένο πορφυρινικό ενδιάμεσο. Η επίτευξη της αναγέννησης του ενζύμου επιτυγχάνεται με την οξείδωση ακόμη ενός μορίου Mn^{2+} σε Mn^{3+}που ακολουθείται από την απελευθέρωση ενός ακόμη μορίου νερού. Έτσι, ενώ η πρώτη ένωση στον καταλυτικό κύκλο της MnP ομοιάζει με εκείνη στον αντίστοιχο καταλυτικό κύκλο της LiP αλλά και άλλων υπεροξειδάσων, η δεύτερη ένωση ανάγεται αργά με άλλα υποστρώματα εκτός του Mn^{2+}, με την παρουσία του να είναι αναγκαία στην ολοκλήρωση του καταλυτικού κύκλου. Συγχρόνως, μη φαινολικές ενώσεις μπορούν να οξειδωθούν από την υπεροξειδάση του Μαγγανίου, με τη συμβολή του οξυγόνου και του GSH, αλλά και ακόρεστων λιπαρών οξέων.



Εικόνα 2.5: Ο καταλυτικός κύκλος της MnP

2.4.4. Εφαρμογές υπεροξειδασών/λιγνινολυτικών ενζύμων στη βιοτεχνολογία

Η χρήση των λιγνινολυτικών ενζύμων σε ποικίλες διεργασίες εντός των τομέων της βιομηχανίας και βιοτεχνολογίας εμφανίζεται συνεχώς αυξανόμενη, καθώς αυτά παρουσιάζουν δυνατότητα εφαρμογής τους σε διάφορους τομείς της παραγωγικής διαδικασίας. Αυτό οφείλεται στην ιδιαίτερη ικανότητα τους να οξειδώνουν μια ευρεία γκάμα οργανικών ενώσεων και στην ύπαρξη υψηλού οξειδωτικού δυναμικού που εμφανίζουν και τα θέτει ικανά να οξειδώσουν ανθεκτικές ενώσεις στην αποικοδόμηση. Έτσι, αξιοποιούνται σε πολυποίκιλες εφαρμογές και σε τομείς όπως η βιοαποικοδόμηση τοξικών αποβλήτων, η επεξεργασία πρώτων υλών στις διάφορες βιομηχανίες (τροφίμων, ποτών, καλλυντικών) και σε άλλους που αναπτύσσονται αναλυτικότερα παρακάτω.

- ***Βιομηχανίες υφασμάτων και χρωστικών*** : Σε μια κίνηση για το μέλλον που στοχεύει στην βελτίωση των ήδη υπαρχόντων και όχι ιδιαίτερα αποδοτικών

και οικονομικών διεργασιών επεξεργασίας αποβλήτων των εν λόγω βιομηχανιών, η ανάπτυξη διεργασιών με καταλύτη τη λακκάση βρίσκεται σε πρώτο πλάνο, καθώς παρουσιάζει την ικανότητα αποδόμησης χρωστικών με ποικίλες χημικές δομές. Τα ίδια ισχύουν και για την υπεροξειδάση της λιγνίνης, καθώς η τελευταία ήδη έχει χρησιμοποιηθεί στον αποχρωματισμό συνθετικών βαφών που χρησιμοποιούνται σε εκτεταμένη κλίμακα στη βιομηχανία.

- ***Βιομηχανίες τροφίμων*** : Τα λιγνινολυτικά ένζυμα βρίσκουν εφαρμογή σε διεργασίες μετατροπής ή ενίσχυσης του χρώματος των προϊόντων των εν λόγω βιομηχανιών (τρόφιμα, ποτά), ουσιαστικά λόγω της δυνατότητας που εμφανίζουν στην εξάλειψη των μη επιθυμητών φαινολικών ενώσεων που ευθύνονται για την αμαύρωση και τη θολερότητα στις αντίστοιχες περιπτώσεις.
- ***Βιομηχανίες χαρτιού*** : Λιγνινολυτικά ένζυμα όπως η λακκάση χρησιμοποιούνται ως βιο-πολτοποιητικά μέσα κατά την επεξεργασία του ξύλου, έχοντας τη δυνατότητα της μερικής αποδόμησης της λιγνίνης, όντας συγχρόνως φιλικότερη για το περιβάλλον από τις συνηθέστερες επικρατούσες μεθόδους πολτοποίησης, τόσο λόγω εξοικονόμησης ενέργειας όσο και λόγω μειωμένης τοξικότητας των αποβλήτων της.
- ***Αποθείωση ορυκτών καυσίμων*** : Η εκπομπή των επικίνδυνων θειούχων ενώσεων που προέρχονται από τα ορυκτά καύσιμα μπορεί να μειωθεί σημαντικά με την (εναλλακτική των επικρατούσων και αρκετά κοστοβόρων μεθόδων) χρήση λιγνινολυτικών ενζύμων, καθώς σε αυτήν την περίπτωση, η αποθείωση συμβαίνει σε πιο ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, όντας συγχρόνως σαφώς αποτελεσματικότερη.
- ***Βιομηχανίες καλλυντικών*** : Οι σημαντικότερες των εφαρμογών που αφορούν τις εν λόγω βιομηχανίες βασίζονται στη δράση υπεροξειδάση της λιγνίνης και αφορούν μεθόδους λεύκανσης του δέρματος ή αλλαγής χρωματικού τόνου αυτού, θεραπεία των πανάδων αλλά και των δερματικών κηλίδων. Σε άλλες εφαρμογές, έχουν απομονωθεί υπεροξειδάσες που εμφανίζουν ικανότητα αποικοδόμησης της μελανίνης των μαλλιών (συνθετικών και οργανικών), δίνοντας εναλλακτικές μεθόδους σε ό,τι αφορά προβλήματα δερματικής δυσανεξίας και χημικής επεξεργασίας μαλλιών, προσφέροντας σαφώς ηπιότερες χημικά συνθήκες από τις ήδη υπάρχουσες.
- ***Εξυγίανση ρυπασμένων περιοχών*** : Η καταστροφή ή μετατροπή των ρύπων μιας επιμολυσμένης περιοχής με χρήση των κατάλληλων λιγνινολυτικών ενζύμων είναι μια τεχνική βιοεξυγίανσης που έχει αρχίσει να βρίσκει εφαρμογή τα τελευταία χρόνια. Η αποικοδόμηση των ξενοβιοτικών ενώσεων είναι το κύριο μέλημα αυτών των εφαρμογών, ενώ επίμονες τοξικές ενώσεις όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες εμφανίζουν σοβαρές

επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και στον άνθρωπο, οι οποίες όμως αποδομούνται από ένζυμα όπως η λακκάση και άλλα.

Κεφάλαιο 3: Πειραματικό μέρος

3.1 Υλικά

3.1.1 Μικροοργανισμοί

Στην εν λόγω διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μικροοργανισμοί :

Βασιδιομύκητες

Χρησιμοποιήθηκαν δύο μικροοργανισμοί που ανήκουν στους βασιδιομύκητες λευκής σήψης, οι οποίοι και παραλήφθηκαν από τη μυκητοθήκη του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και ήταν οι εξής :

- Pleurotus Citrinopileatus LGAM 28684
- Irpex Lacteus LGAM 238

	P.Citrinopileatus	***I.Lacteus***
Βασίλειο	Fungi	Fungi
Φύλο	Basidiomycota	Basidiomycota
Κλάση	Agaricomycetes	Agaricomycetes
Τάξη	Agaricales	Polyporales
Οικογένεια	Pleurotaceae	Meruliaceae
Γένος	*Pleurotus*	*Irpex*
Είδος	*Pleurotus citrinopileatus*	*Irpex lacteus*

Πίνακας 3.1: Ταξινόμηση χρησιμοποιούμενων βασιδιομυκήτων (Mycobank)

Τα στελέχη παρελήφθησαν και διατηρήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA σε θερμοκρασία 4 ^{o}C.

Ζυμομύκητες

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος X33 άγριου τύπου της ζύμης PIchia Pastoris ως φορέας έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών. Επιλέχθηκε για τη συγκεκριμένη διαδικασία με κριτήριο το χαρακτηριστικό του να αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας τη μεθανόλη ως μόνη πηγή άνθρακα. Συγχρόνως, ο εν λόγω μύκητας εμφανίζει ποικίλα πλεονεκτήματα στην έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, έχοντας τη δυνατότητα ανάπτυξης με υψηλούς ρυθμούς σε θρεπτικά υποστρώματα χαμηλού κόστους, εμφανίζοντας μεταφραστικές τροποποιήσεις αν κριθούν απαραίτητες και χαρακτηριζόμενος από μειωμένα επίπεδα έκκρισης ενδογενών πρωτεϊνών, διευκολύνοντας την απομόνωση των υψηλά εκκρινόμενων ετερόλογων πρωτεϊνών.

Βακτήρια

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Escherichia coli TOP10 της εταιρείας Invitrogen (Η.Π.Α.) για τον πολλαπλασιασμό και κλωνοποίηση των πλασμιδιακών φορέων.

3.1.2. Χημικά αντιδραστήρια – Αναλώσιμα υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν χημικά αντιδραστήρια τα οποία προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Merck – Millipore (Γερμανία), AppliChem (Γερμανία) kai Sigma – Aldrich (Η.Π.Α.) και η καθαρότητα τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα γυάλινα και πλαστικά εργαστηριακά υλικά προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), Greiner-Bio One (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Merck – Millipore (Γερμανία) και Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο). Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρήση στηλών χρωματογραφίας υλικού Talon ™ των Clontech Laboratories Inc. (Η.Π.Α.).

3.1.3 Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία παρασκευάστηκαν με χρήση απιονισμένου νερού και όπως παρουσιάζεται στον κάτωθι πίνακα :

Ρυθμιστικά Διαλύματα	
Ρ-Δ Talon	20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0
ΤΕ	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TBE 10X	108gL^{-1}Trisbase,55gL^{-1}βορικόοξύ,40mLL^{-1}EDTA0,5M, pH 8,0
Ρ-Δ δείγματος ηλεκτροφόρησης αγαρόζης	900 μL γλυκερόλη 50% (v/v), 100 μL Μπλε Βρωμοφαινόλης 10×
ΡΔ φωσφορικών για θρεπτικό μέσο BMGY-BMMY	132 mL K2HPO4 1M, 868 mL KH2PO4 1M, pH 6,0

Ρ-Δ δείγματος ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE	3,55 mL 0,25M Tris Base pH 6,8, 1,8 mL Γλυκερόλη 50% (v/v), 1,8 mL β–Μερκαπτοαιθανόλη, 0,71 gr SDS, 2,85 mL μπλε βρωμοφαινόλης 0,1 % (w/v)
Ρ-Δ ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE	3,03 g L-1 Tris-base, 14,4 g L-1 γλυκίνη, 1 g L-1 SDS, pH 8,3
Χρωματισμός πηκτώματος SDS-PAGE	0,4% (w/v) Coomassie G-250, 400 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 500 mL ddH2O
Αποχρωματισμός πηκτώματος SDS-PAGE	200 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 700 mL ddH2O

Πίνακας 3.2: Αναλυτική σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων

3.1.4. Θρεπτικά υποστρώματα

Για τις προκαλλιέργειες των μικροοργανισμών έγινε χρήση υποστρώματος υγρού αποβλήτου ελαιουργείου, επεξεργασμένου καταλλήλως και αραιωμένου 1:4 με χρήση απιονισμένου νερού. Πριν τη χρήση του, το pH του ρυθμίστηκε στο 6 με 3 V καυστικού νατρίου (NaOH) και το υγρό απόβλητο ελαιουργείου υπέστη φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 20 λεπτά και στους 4 ^{o}C. Ακολούθως, το υγρό απόβλητο διηθήθηκε με χαρτί χρωματογραφίας Whatman no.1 ώστε να αφαιρεθούν τα τυχόν ανεπιθύμητα στερεά και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -20 ^{o}C μέχρι να απαιτηθεί η χρησιμοποίηση του.

Τα θρεπτικά υποστρώματα παρασκευάστηκαν με χρήση απιονισμένου νερού και αποστειρώθηκαν εντός αυτόκαυστου σε θερμοκρασία 121 ^{o}C για 20 λεπτά και σε πίεση 0,1 mPa.

Θρεπτικά Υποστρώματα	
Buffered Glycerol Complex Medium (BMGY)	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 100 mM ΡΔ φωσφορικών (132 mL K2HPO4 1M, 868 mL KH2PO4 1M, pH 6.0), 1.34% (w/v) YVB (34 g L^{-1} YNB χωρίς θειϊκό αμμώνιο και αμινοξέα, 100 g L^{-1} θειϊκό αμμώνιο), 4x10-5% (w/v) βιοτίνη, 1% (v/v) γλυκερόλη
Buffered Methanol Complex Medium (BMMY)	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 4×10-5% (w/v) βιοτίνη, 0.5% (v/v) μεθανόλη, 100 mM ΡΔ φωσφορικών, pH 6.0, 1.34% (w/v) YVB
MM- άγαρ (Mininal Methanol medium)	yeast nitrogen base 0.34% (w/v), 1% (w/v) θειϊκό αμμώνιο, 0.5 % (v/v) μεθανόλη, 0,00004 % (w/v) βιοτίνη, 1,5% (w/v) άγαρ
Υγρό θρεπτικό μέσο YPD ± ζεοσίνη	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 2% (w/v) δεξτρόζη ± 100 μg mL^{-1} ζεοσίνη
Στερεό θρεπτικό μέσο YPD + ζεοσίνη	YPD με 2% (w/v) άγαρ ± 100 μg mL-1 ζεοσίνη

Στερεό θρεπτικό μέσο YPDS + ζεοσίνη	YPD με 1,5% (w/v) άγαρ, 1 M σορβιτόλη ± 100 μg mL-1 ζεοσίνη
Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα βακτηρίων LB (Luria Bertani) + καναμυκίνη	1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, pH 7,4 ± 50 μg mL-1 καναμυκίνη
Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα βακτηρίων LB + καναμυκίνη	LB με 1,5% (w/v) άγαρ ± 50 μg mL-1 καναμυκίνη
Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα βακτηρίων LS-LB (χαμηλής αλατότητας LB) ± ζεοσίνη (zeocin)	0,5% (w/v) NaCl, 1% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, pH 7,4 ± 25 μg mL-1 ζεοσίνη
Στερεό υπόστρωμα Βακτηρίων LS-LB ± ζεοσίνη	LB με 1,5% (w/v) άγαρ ± 25 μg mL-1 ζεοσίνη
Υγρό θρεπτικό μέσο M. thermophila	1 g L-1 K2HPO4, 0,5 g L-1 MgSO4.7H2O, 0,1 g L-1 CaCl2.2H2O, 10 g L-1 εκχύλισμα ζύμης, 1% (w/v) γλυκόζη, pH 5,0
Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα μυκήτων PDA	3,9% (w/v) άγαρ από ζωμό πατάτας και δεξτρόζη
Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα μυκήτων Υγρού Απόβλητου Ελαιουργείου	P-Δ φωσφορικών, 50 mM, pH 6, 50% (v/v), κατσίγαρος 50% (v/v), 1,5% (w/v) άγαρ
Υγρό Θρεπτικό Υπόστρωμα Ξυλόζης Βασιδιομυκήτων	Ξυλόζη 57 g L-1, Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract) 30 g L-1, K2HPO4 1 g L-1, MgSO4. 7H2O 0,2 g L-1
Υγρό Θρεπτικό Υπόστρωμα Υγρού Απόβλητου Ελαιουργείου Βασιδιομυκήτων	P-Δ φωσφορικών, 50 mM, pH 6, 50% (v/v), κατσίγαρος 50% (v/v), Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract) 30 g L-1

Πίνακας 3.3: Αναλυτική σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων.

3.1.5. Όργανα – Συσκευές

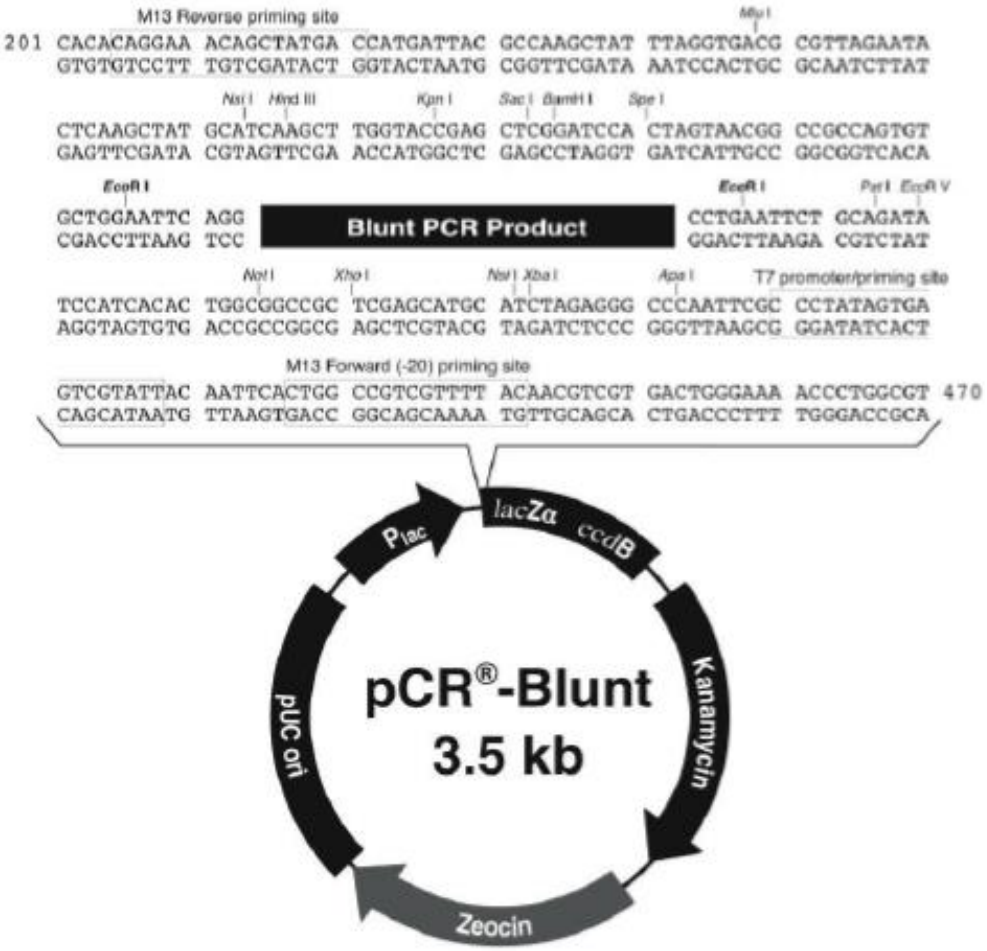
- Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τις απαιτήσεις της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι οι εξής, όπως αυτές περιγράφονται παρακάτω:
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave SANYO (Η.Π.Α.)

- Αναδευόμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία).
- Βιοαντιδραστήρες υγρής καλλιέργειας BIOFLO® & CELLIGEN® 310 (New Brunswick Scientific, Eppendorf Inc., CT, Η.Π.Α.) όγκου 2 L
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες.
- Μονάδα διαχωρισμού, ελέγχου και ανάπτυξης ηλεκτροφορήσεων (PhastSystem, Pharmacia, Σουηδία).
- Μονάδα ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό πρωτεϊνών Mini-PROTEAN 3 (BIORAD, Η.Π.Α.).
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα).
- Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού RE111 (Büchi, Σουηδία).
- Πολυφωτόμετρο microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech)
- Συλλέκτης κλασμάτων (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).
- Συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης TC-512 TECHNE (Η.Π.Α.).
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία).
- Συσκευή διήθησης υπό κενό.
- Συσκευή λυοφιλίωσης (freeze drying), Christ ALPHA 1-4, B.Braun Biotec. International, Melsungen, (Γερμανία).
- Συσκευή ηλεκτρικής τροφοδοσίας E863 CONSORT (Βέλγιο).
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ BIORAD (Η.Π.Α.).
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης αγαρόζης Easigel H1-set Scie-plas (Μεγάλη Βρετανία).
- Συσκευή μέτρησης pH, WTW 537 (WTW, Γερμανία).
- Συσκευή υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400, 400 mL και 50 mL και μεμβράνες PM-10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.).
- Συσκευή φωτογράφησης σε θάλαμο InGenius BioImaging Syngene (Μεγάλη Βρετανία) και λογισμικό GeneSnap v6.05 και GeneTools v3.06.
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q (Millipore, Η.Π.Α.).
- Σύστημα χρωματογραφίας διαχωρισμού πρωτεϊνών (ECONO gradient pump, BIORAD, Η.Π.Α. και Waters 600E, Millipore, Η.Π.Α.).
- Φυγόκεντροι Model J2-21 και TJ-6 Beckman Coulter (Η.Π.Α.), ALC 4239R (Μεγάλη Βρετανία) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία).
- Φωτόμετρο Hitachi UV 2000 (Η.Π.Α.).
- Αντλία HPLC LC-20AD (Shimadzu), συνδεδεμένη με ανιχνευτή UV-Vis ProStar 335 Diode Array detector (Agilent Technologies).

3.1.6. Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης και κλωνοποίησης

3.1.6.1. pCR Blunt

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε χρήση του πλασμιδιακού φορέα pCR Blunt της εταιρείας Invitrogen για να κλωνοποιηθούν τμήματα DNA με ισοτελή άκρα. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο έφερε γονίδιο θανάτου (ccdB), ώστε να προκύψει επιλογή των επιθυμητών φορέων από εκείνουν που δεν διέθεταν το υπό μελέτη ένθεμα. Έτσι, όταν το ένθεμα έχει ανασυνδυαστεί επιτυχώς προκύπτει διακοπή του γονιδίου, με αποτέλεσμα οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι που προκύπτουν να αναπτύσσονται εντός του θρεπτικού μέσου με χρήση επιλεγμένου αντιβιοτικού.

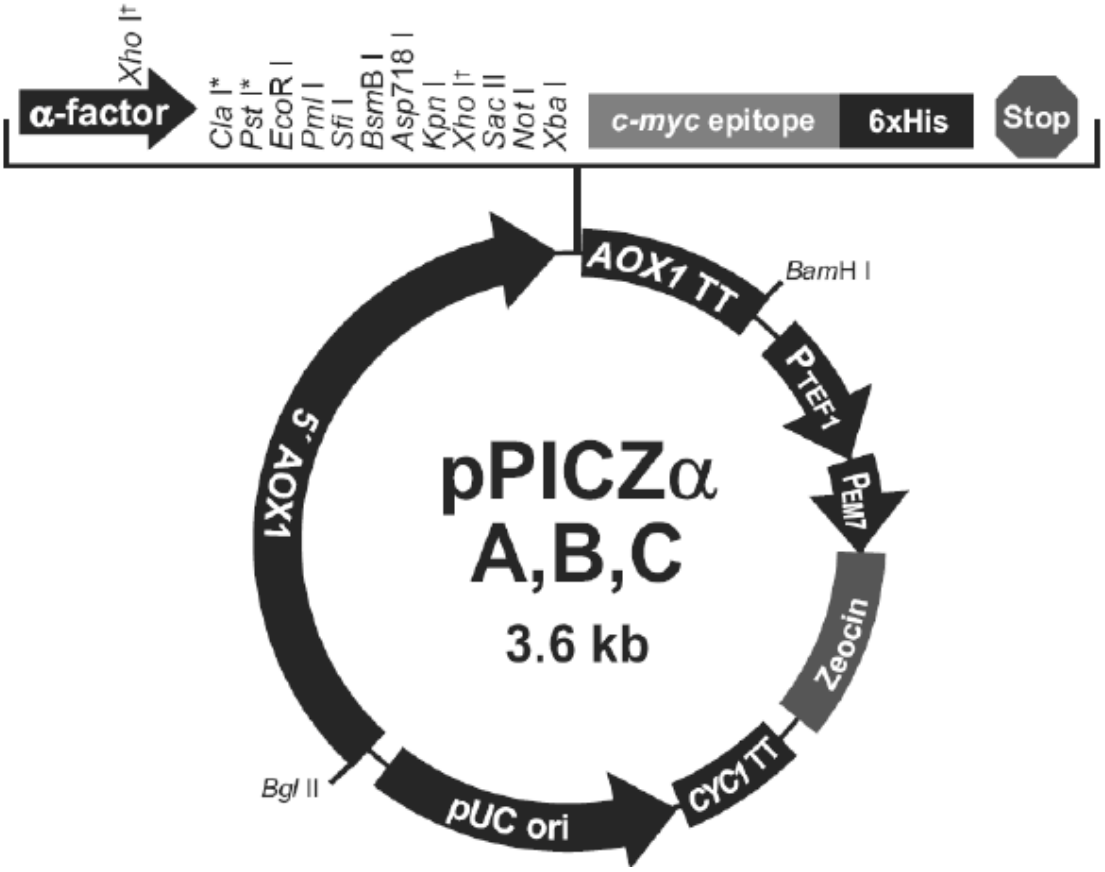


Εικόνα 3.1: Περιοριστικός χάρτης του pCR Blunt πλασμιδιακού φορέα.

3.1.6.2. pPICZaC / pPICZaA

Ο μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων Pichia Pastoris επιτεύχθηκε με χρήση πλασμιδιακών φορέων pPICZaC / pPICZaA και είχε ως στόχο την έκφραση των επιθυμητών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και, ακολούθως, την έκκριση αυτών στο περιβάλλον μέσο. Οι εν λόγω φορείς παρουσιάζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που τους κάνουν ιδανικούς για αυτόν το σκοπό, τα εξής:

- Σηματοδοτική αλληλουχία a-factor του ζυμομύκητα Saccharomyces Cerevisiae, η οποία επιτρέπει την έκκριση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο περιβάλλον μέσο.
- Γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη (zeocin).
- Αλληλουχία – υποκινητής του γονιδίου της αλκοολικής οξειδάσης AOX1 και περιοχή ομολογίας που επιτρέπει την ενσωμάτωση στο γενωμικό DNA του Pichia Pastoris.
- Επίτοπο του c-myc και έξι κωδικόνια His, τα οποία και επιτρέπουν τον καθαρισμό των ετερόλογων πρωτεϊνών με στήλες χρωματογραφίας ιόντων μετάλλου.



Εικόνα 3.2: Περιοριστικός χάρτης των pPICZa πλασμιδιακών φορέων.

3.2.Καλλιέργειες μικροοργανισμών

3.2.1.Στερεές και υγρές καλλιέργειες βασιδιομυκήτων

3.2.1.1.Στερεές καλλιέργειες

Οι στερεές καλλιέργειες βασιδιομυκήτων τελέσθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA ή YAE. Για τον εμβολιασμό, στο κέντρο των τρυβλίων εναποτέθηκαν τετράγωνα τεμάχια άγαρ, πλευράς 6mm, τα οποία είχαν αποκοπεί από τα άκρα αναπτυσσόμενης στερεής καλλιέργειας, σε ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 27 ^{o}C για 10 ημέρες σε σκοτεινές συνθήκες, και ακολούθως αποθηκεύτηκαν στους 4 ^{o}C ή χρησιμοποιήθηκαν άμεσα για τον εμβολιασμό υγρών καλλιεργειών.

3.2.1.2.Υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Οι υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας τελέσθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης ή Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου. Για τον εμβολιασμό τους, χρησιμοποιήθηκαν τετράγωνα κομμάτια άγαρ πλευράς 6mm, τα οποία είχαν αποκοπεί από τα άκρα αναπτυσσόμενης στερεής καλλιέργειας, σε ασηπτικές συνθήκες, (1 κομμάτι ανά 30 mL καλλιέργειας). Σε ό,τι αφορά τις υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό υπόστρωμα Υγρό Απόβλητο Ελαιουργείου, χρησιμοποιήθηκε επίσης ως μάρτυρας και μια κωνική φιάλη, η οποία δεν είχε εμβολιαστεί με το μικροοργανισμό. Οι υγρές καλλιέργειες Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου όγκου 30 mL πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 mL, ενώ οι καλλιέργειες όγκου 100 mL πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Μετά τον εμβολιασμό, οι κωνικές φιάλες επωάστηκαν στους 27 ^{o}C, σε σκοτεινές συνθήκες και με ήπια ανάδευση 80 rpm, για 22 ημέρες, στην περίπτωση των καλλιεργειών με θρεπτικό υπόστρωμα Υγρό Απόβλητο Ελαιουργείου, ή για 12 ημέρες, στην περίπτωση των καλλιεργειών με θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών παρακολουθούνταν με λήψη δειγμάτων ανά τακτά χρονικά διαστήματα, και τέλεση των ανάλογων αναλύσεων.

3.2.1.3.Ανάπτυξη βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα

Για την ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες προκαλλιέργειες όγκου 100 mL σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης. Μετά από επώαση 12 ημερών, ώστε να έχει αναπτυχθεί ικανή ποσότητα βιομάζας, οι προκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των βιοαντιδραστήρων όγκου 2 L. Ο όγκος της καλλιέργειας ήταν 1700 mL, ενώ για κάθε στέλεχος τελέσθηκαν ταυτόχρονα δύο καλλιέργειες, μια σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης και μια σε θρεπτικό υπόστρωμα Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου. Η θερμοκρασία των καλλιεργειών διατηρούνταν στους 28 ^{o}C, ενώ το pH στην τιμή 6 με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλυμάτων HCl ή NaOH 1M, ανάλογα με την περίπτωση. Η

ανάδευση ρυθμίστηκε στα 80 rpm, και ο αερισμός στο 1 vvm, ώστε το διαλυμένο οξυγόνο να διατηρείται πάνω από το 10% της τιμής κορεσμού. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών παρακολουθούνταν με λήψη δειγμάτων σε καθημερινή βάση, στα οποία πραγματοποιούνταν οι ανάλογες αναλύσεις. Με το πέρας των καλλιεργειών, το εξωκυτταρικό υγρό διαχωρίστηκε από τη βιομάζα με τη διαδικασία της διήθησης και διατηρήθηκε στους -20 ^{o}C μέχρι γίνει χρήση του. Η βιομάζα, μετά από διαδοχικές πλύσεις, υπέστη λυοφιλίωση μέχρι σταθερό βάρος και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη μέχρι την περαιτέρω χρήση της.

3.2.1.4.Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων

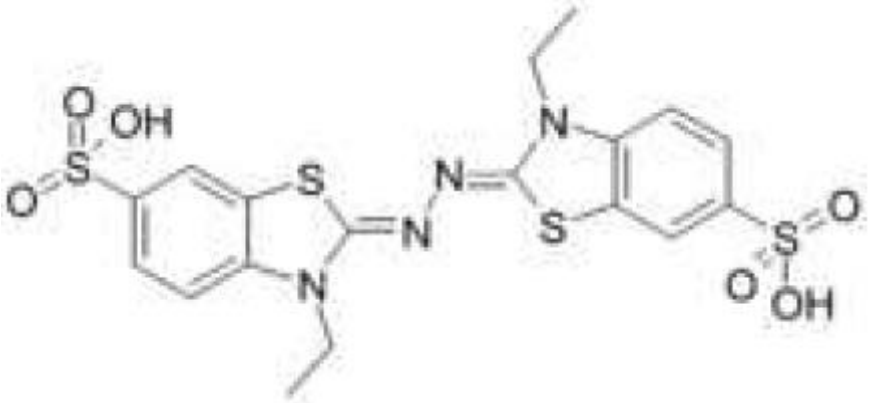
Η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων στα υπό μελέτη δείγματα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Η μέθοδος βασίζεται στη δημιουργία έγχρωμου συμπλόκου μεταξύ του αντιδραστηρίου DNS και του ελεύθερου ημιακεταλικού υδροξυλίου των αναγωγικών σακχάρων. Έτσι μπορεί να προσδιοριστεί χρωματομετρικά η συγκέντρωσή τους. Αναλυτικά, σε κάθε δείγμα προστέθηκε ίσος όγκος αντιδραστηρίου DNS, με σύσταση: 16 g L $^{-1}$ NaOH, 10 g L $^{-1}$ δινιτροσαλικυλικού οξέος, 402.7 g L $^{-1}$ K, Na-tartrate. Μετά από ανάμιξη, τα δείγματα επωάστηκαν για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο 100 ^{o}C και ακολούθως προστέθηκαν 8 όγκοι νερού. Μετά από εκ νέου ανάμιξη, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 540 nm έναντι τυφλού διαλύματος, στο οποίο αντί για δείγμα είχε προστεθεί απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς του επιθυμητού σακχάρου.

3.2.1.5.Προσδιορισμός φαινολικού φορτίου

Η μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu είναι ένα μίγμα φωσφο-μολυβδικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος και χρησιμοποιείται για το χρωματομετρικό προσδιορισμό των φαινολικών και πολυφαινολικών ενώσεων. Η διαδικασία προσδιορισμού ήταν η εξής: Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 100 μL δείγμα κατάλληλα αραιωμένο (ή πρότυπο), 7,9 ml απιονισμένο νερό και 500 μl αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu. Το μίγμα αναδεύτηκε σε vortex και αφέθηκε σε ηρεμία για χρονικό διάστημα 30 s - 8 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 1500 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3. Μετά την εκ νέου ανάδευση με χρήση vortex, το δείγμα αφέθηκε σε ηρεμία είτε για 2 h στους 20°C, είτε για 30 min σε υδατόλουτρο στους 40°C. Τέλος, το δείγμα φωτομετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης στα 765 nm με τυφλό, αντιστοίχως παρασκευασμένο δείγμα όπου στη θέση των 100 μL δείγματος, προστέθηκε 100 μL απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο δείγμα προσδιορίστηκε με τη βοήθεια κατάλληλης πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος, οπότε η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων εκφράστηκε σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

3.2.1.6. Προσδιορισμός ενεργότητας λακκάσης

Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών και των υδροξυλομάδων της λιγνίνης από τη λακκάση τελείται με την απόσπαση ενός ηλεκτρονίουκαι τον επακόλουθο σχηματισμό ριζών, ικανά δραστικών ώστε να έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις. Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της λακκάσης συμβαίνει φασματομετρικά, καθώς η συγκέντρωση των επιθυμητών για προσδιορισμό χημικών ουσιών συνδέεται με την απορρόφηση με το νόμο των Lambert και Beer : A = ε*b*C (όπου b: οπτική διαδρομή, C: συγκέντρωση δείγματος, ε: γραμμομοριακή απορροφητικότητα). Η εδώ χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της λακκάσης απαιτεί την φωτομέτρηση του δείγματος με χρήση του φωτόμετρου SPECTRAmax 250 στα 420 nm και σε θερμοκρασία 25 ^{o}C. Αντιδραστήριο της μεθόδου είναι το 2,2 – azinobis – (3 – ethylbenzothiaziline – 6 – sulfonate) ή εν συντομία ABTS. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο αποτελεί ένα τεχνητό υπόστρωμα με δομή περεμφερή με εκείνη της λιγνίνης, το οποίο όταν οξειδώνεται παράγει κατιόν ABTS, $ABTS^{+}$, ο οποίο και παρουσιάζει χαρακτηριστικό χρώμα μεταξύ του γαλάζιου και του πράσινου. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 250 μL και η ποσότητα του δείγματος είναι 25 μL. Γίνεται χρήση $C_6H_8O_7$ και K_2HPO_4 ως buffer με τιμή pH = 4 και συγκέντρωση ABTS 0,5 mM.



Εικόνα 3.3: Δομή αντιδραστήριου ABTS

3.2.1.7.Αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου

Ο αποχρωματισμός του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου υπολογίστηκε μετρώντας τη μείωση της οπτικής απορρόφησης του αποβλήτου στα 525 nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ποσοστό % της μείωσης του χρώματος του αρχικού αποβλήτου.

3.2.2.Υγρές και στερεές καλλιέργειες του μύκητα Myceliophthora thermophila

Η ανάπτυξη του μύκητα Myceliophthora thermophila πραγματοποιήθηκε αρχικά σε στερεές καλλιέργειες, σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA όπως αναφέρεται σε προηγούμενο υποκεφάλαιο, στην αρχή με επώαση 4 ημερών στους 47 ^{o}C, και στη συνέχεια για 2 ακόμη ημέρες στους 60 ^{o}C με σκοπό την παραγωγή σπορίων. Οι καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό υγρών καλλιεργειών όγκου 100 mL σε κωνικές φιάλες των 250 mL, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενο υποκεφάλαιο. Οι υγρές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 47 ^{o}C, 200 rpm για 4 ημέρες με σκοπό την παραγωγή βιομάζας.

3.2.3.Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων

Τα στελέχη E. coli TOP10 αναπτύχθηκαν σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB ή LS-LB σε θερμοκρασία 37 ^{o}C με ή χωρίς προσθήκη κατάλληλου αντιβιοτικού. Οι υγρές καλλιέργειες όγκου 5 mL πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες 25 mL, για 16 h με ανάδευση στις 200 rpm. Οι στερεές καλλιέργειες επωάστηκαν επίσης σε κατάλληλους κλιβάνους στους 37 ^{o}C για 16 h. Τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν στους 4 ^{o}C μέχρι τη περαιτέρω χρήση τους και για διάστημα μικρότερο των δύο εβδομάδων.

3.2.4.Υγρές και στερεές καλλιέργειες Ζυμομυκήτων

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος αγρίου τύπου X33 του ζυμομύκητα Pichia pastoris. Ο ζυμομύκητας αναπτύχθηκε σε υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό YPD, στους 30 ^{o}C και υπό ανάδευση στις 200 rpm. Οι αντίστοιχες στερεές καλλιέργειες του ζυμομύκητα επωάστηκαν για 48 ώρες στους 30 ^{o}C και τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν στους 4 ^{o}C για διάστημα μέχρι 4 εβδομάδων.

Για τη φύλαξη των επιθυμητών στελεχών Pichia pastoris για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, ο μύκητας αναπτύχθηκε σε υγρές καλλιέργειες YPD για 16 h σε 200 rpm στους 30 ^{o}C. Τα κύτταρα πάρθηκαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο YPD με προσθήκη 15% (v/v) γλυκερόλης, έτσι ώστε η τελική OD600 να είναι 50-100.

3.2.4.1.Στερεές καλλιέργειες του ζυμομύκητα P. pastoris για επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων

Τα μετασχηματισμένα στελέχη Pichia pastoris τα οποία εμφάνισαν αντοχή στο αντιβιοτικό ζεοσίνη και προέκυψαν από το μετασχηματισμό με τους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, ελέγχθηκαν ως προς την ενεργότητα υπεροξειδάσης ή

λακκάσης σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν ABTS και μεθανόλη για επαγόμενη έκφραση του ενζύμου. Από τους ανθεκτικούς κλώνους που προέκυψαν, 30 αποικίες εμβολιάστηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε 1,34% yeast nitrogen base, $4*10^{-5}$ % (w/v) βιοτίνη, 0.5% (v/v) μεθανόλη, και 2 mM ABTS. Οι στερεές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 30 ^{o}C για 4 ημέρες. Η ενεργότητα λακκάσης εντοπίστηκε από την εμφάνιση πράσινου χρώματος γύρω από την αναπτυσσόμενη αποικία. Όταν η ανίχνευση ενεργότητας υπεροξειδάσης ήταν επιθυμητή, μετά το σχηματισμό αποικιών, προστέθηκε επάνω από κάθε αποικία μια σταγόνα διαλύματος 1 mM H_2O_2, και τα τρυβλία επωάστηκαν επιπλέον 10 min ώστε να αναπτυχθεί το πράσινο χρώμα.

3.3. Μοριακές Τεχνικές

3.3.1. Απομόνωση γενετικού υλικού – Ανάλυση γενωμικού DNA

Για την απομόνωση γενετικού υλικού από νηματοειδείς ασκομύκητες, η βιομάζα που αναπτύχθηκε σε υγρές καλλιέργειες πάρθηκε με τη διαδικασία της φυγοκέντρησης. Κατόπιν διαδοχικών πλύσεων με απιονισμένο νερό, ακολούθησε ταχεία ψύξη της με υγρό άζωτο και κονιορτοποίηση σε γουδί μέχρι την παραγωγή ~100 mg κονιορτοποιημένου μυκηλίου. Η απομόνωση καθαρού DNA από τα κυτταρικά θραύσματα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του τυποποιημένου πακέτου χημικών αντιδραστηρίων της Sigma – Aldrich (Η.Π.Α), GenElute ™ Plant, Genomic DNA Miniprep Kit.

3.3.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα E. coli πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του τυποποιημένου εμπορικού σκευάσματος αντιδραστηρίων της εταιρείας Macherey-Nagel, NucleoSpin® Plasmid.

3.3.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο διαχωρισμός μορίων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μετακίνηση των γραμμικών μορίων DNA μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης, με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους, εάν εφαρμοστεί σε αυτά ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA, καθώς και την ένταση του ρεύματος που εφαρμόζεται. Στην εν λόγω διπλωματική εργασία,

παρασκευάστηκαν πηκτώματα αγαρόζης συγκέντρωσης 1 % (w.v) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου, για την οπτικοποίηση των ζωνών DNA. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες οπές του πηκτώματος, μετά από ανάμιξή τους με το διάλυμα χρώσης (loading buffer), και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE, κάτω από ηλεκτρική τάση 60-80 Volt για 1 h περίπου. Ακολούθως, το πήκτωμα τοποθετήθηκε επάνω σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας, έτσι ώστε να εμφανιστούν και να φωτογραφηθούν οι ζώνες του DNA που προέκυψαν. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των ζωνών που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μάρτυρα DNA γνωστών μοριακών βαρών. Οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό ήταν ο FastGene® 1 kb DNA Ladder και ο FastGene® 100 bp DNA Ladder, της εταιρείας NIPPON Genetics Europe GmbH (Ελβετία).

3.3.4. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση του DNA από πηκτώματα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εμπορικού κιτ αντιδραστηρίων της εταιρείας Sigma, GenElute™ Gel Extraction Kit.

3.3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Επικαλυπτόμενη PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι ο in vitro πολλαπλασιασμός επιλεγμένων αλληλουχιών DNA με τη βοήθεια συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές, primers), τα οποία είναι συμπληρωματικά με την αλληλουχία του 3’ άκρου καθεμιάς από τις δυο συμπληρωματικές αλυσίδες DNA. Εκτός από τους εκκινητές, για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτούνται επίσης και μια θερμοανθεκτική πολυμεράση, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και διάλυμα αλάτων που θα εξασφαλίσουν τις βέλτιστες συνθήκες για τη δράση της, όπως επίσης και διαδοχική εναλλαγή θερμοκρασιών. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη επέκταση και των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων, με αποτέλεσμα τον ταχύτατο πολλαπλασιασμό των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους, καθένας από τους οποίους αποτελείται από τα παρακάτω θερμοκρασιακά στάδια: (α) αποδιάταξη (denaturation) του DNA στόχου, (β) πρόσδεση των εκκινητών (annealing) και (γ) επέκταση των εκκινητών (extension). Τα καινούρια μόρια DNA που σχηματίζονται σε κάθε κύκλο, χρησιμοποιούνται στον επόμενο ως μήτρα για την αντιγραφή νέων μορίων, με αποτέλεσμα ο αριθμός των αντιγράφων του τμήματος-στόχου να αυξάνεται εκθετικά. Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα

προϊόντα μπορούν να ελεγχθούν, ποσοτικά και ποιοτικά, με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ενός συγκεκριμένου δείγματος της αντίδρασης.

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις PCR επιλέχθηκαν με βάση τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της πολυμεράσης KOD Hot Start (Novagen, Η.Π.Α.) και τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (Tm, η θερμοκρασία στην οποία το 50% της αλληλουχίας του εκκινητή είναι μετουσιωμένο), η οποία υπολογίστηκε από τον μαθηματικό τύπο: Tm= (wA+xT)*2 + (yG+zC)*4, όπου w, x, y και z, ο αριθμός των νουκλεοτιδίων A, T, G και C αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή TC-512 της εταιρείας TECHNE (Η.Π.Α.), σε τελικό όγκο 50 μL, σύμφωνα με τα παρακάτω :

Συστατικά μίγματος αντίδρασης PCR		**Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο**		
DNA	α μL (10-500 ng)	**Αρχική αποδιάταξη**	94-98 °C για 1-9 min	
Εκκινητής forward	1 μL	**Αποδιάταξη DNA-στόχου (denaturation)**	94-98 °C για 10-30 sec	20 – 40 κύκλοι
Εκκινητής reverse	1 μL	**Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing)**	(Tm-4 °C) για 20-40 sec	
dNTP's mix	5 μL (8 mM)	**Επέκταση εκκινητών (extension)**	68-72 °C για 1 min/kb	
$MgSO_4$ (25 mM)	3 μL	**Τελική επέκταση και επιδιόρθωση**	68-72 °C για 5-15 min	
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης	5 μL (10X)			
Υπερκάθαρο H_2O	34-α μL			
KOD Hot Start πολυμεράση	1 μL (1 U/ μL)			

3.3.6. Απομόνωση εσωνίων από αλληλουχία DNA

Η απομόνωση εσωνίου από το εκάστοτε γονίδιο πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών, συμπληρωματικών ως προς τα άκρα του εσωνίου. Ως μήτρα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR Blunt, στο οποίο είχε κλωνοποιηθεί το επιθυμητό γονίδιο. Με το πέρας της αντίδρασης, το γραμμικό προϊόν κλωνοποιήθηκε εκ νέου στον πλασμιδιακό φορέα pCR Blunt.

3.3.7. Συνένωση μορίων DNA (Ligation)

Η συνένωση μορίων DNA που φέρουν μονόκλωνα και συμπληρωματικά ή ισοτελή άκρα μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Για τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η λιγάση της Εταιρείας TAKARA (Ιαπωνία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα τμήματα DNA με ισοτελή άκρα, όπως για παράδειγμα τα προϊόντα της αντίδρασης PCR, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pCR Blunt, σύμφωνα με τα ακόλουθα :

ΡΔ λιγάσης (10X)	1 μL	Επώαση στους 16 °C για 1-2 h.
Υπερκάθαρο νερό	2 μL	
Προϊόν PCR	5 μL	
Πλασμίδιο pCR®Blunt	1 μL	
Λιγάση (4U/μL)	1 μL	
Συνολικός όγκος	10 μL	

Πίνακας 3.4: Αντιδράσεις συνένωσης επιθυμητών γονιδίων και του φορέα έκφρασης pCR Blunt

3.3.8. Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, είναι ένζυμα κυρίως βακτηριακής προέλευσης, τα οποία έχουν την ικανότητα να κόβουν μονόκλωνα ή δίκλωνα μόρια DNA σε ειδικές αλληλουχίες αναγνώρισης, μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων. Ο ρόλος των ενζύμων αυτών είναι να προστατεύουν τα κύτταρα από εισβολή ξένου DNA, η χρήση τους όμως στη γενετική μηχανική είναι τεράστιας σημασίας.

Έτσι, έγινε χρήση ενζύμων περιορισμού από τις εταιρείες TAKARA (Ιαπωνία) και VEB (Η.Π.Α.), σύμφωνα με τα κατάλληλα πρωτόκολλα της εκάστοτε εταιρείας. Το ένζυμο περιορισμού που επιλέχθηκε παρουσιάζεται ακολούθως :

Ένζυμο περιορισμού	Οργανισμός προέλευσης	Αλληλουχία αναγνώρισης
EcoRI	*Escherichia coli (PY13)*	5´...G▼AATTC...3´ 3´...CTTAA▲G...5´

3.3.9. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων βακτηρίων και μυκήτων

3.3.9.1.Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων E.coli Top10

- Ανάπτυξη 1 αποικίας E.coli (Top 10) σε 5ml LB, 37 ^{o}C, 180rpm, 16 h (προκαλλιέργεια)
- Εμβολιασμός 100 ml LB με 1 ml από την προκαλλιέργεια, 37 ^{o}C, 180 rpm έως ότου το OD600 να πάρει τιμή 0.4-0.8 (2-4 h)
- 30 min επώαση σε πάγο
- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση 1500 g, 5 min
- Επαναδιάλυση των κυττάρων με 12 ml στείρου $MgCl_2$ (4 ^{o}C)
- Νέα φυγοκέντρηση 1500 g, 5 min
- Επαναδιάλυση των κυττάρων με 4 ml στείρου $CaCl_2$ (4 ^{o}C)
- 20 min επώαση σε πάγο
- Προσθήκη 1.9 ml γλυκερόλης 50%, μοίρασμα των κυττάρων σε Eppendorf (~100 μl) και φύλαξη στους -80 ^{o}C μέχρι την χρήση τους

3.3.9.2. Μετασχηματισμός μέσω θερμικού σοκ

Η σύντομη έκθεση των επιδεκτικών σε μετασχηματισμό κυττάρων E.coli σε αυξημένη θερμοκρασία κάνει την μεμβράνη των κυττάρων πιο ρευστή και κατά συνέπεια παροδικά διαπερατή σε ξένο DNA. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πλασμιδίου σε 100 μl επιδεκτικών κυττάρων Top10
- Επώαση 30 min στον πάγο
- Θερμικό σοκ στους 42 ^{o}C για 90 s
- Άμεση προσθήκη 200 μl θρεπτικού LB, επώαση στους 37 ^{o}C για 1 h
- Εμβολιασμός τρυβλίων με κατάλληλο αντιβιοτικό

3.3.9.3. Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων Pichia pastoris

Αρχικά, εμβολιάστηκαν υγρές καλλιέργειες YPD (2-4) όγκου 50 ml (σε κωνικές φιάλες 250 ml) με μικρή ποσότητα κυττάρων Pichia pastoris, 30 ^{o}C, 200 rpm, και επωάστηκαν για 16 h (προκαλλιέργεια). Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

Χρήση 10 ml από τις προκαλλιέργειες για τον εμβολιασμό 2 θρεπτικών μέσων YPD όγκου 300 ml (σε κωνικές φιάλες 1000 ml), 30oC, 200 rpm έως ότου το OD600 να πάρει τιμή 1.3-1.5 (2-4 h)

- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση 5000 g, 5 λεπτάmin
- Επαναδιάλυση σε 300 ml υπερκάθαρου νερού, θερμοκρασίας 4 ^{o}C
- Νέα φυγοκέντρηση 5000 g, 5 min
- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 150 ml υπερκάθαρου νερού, θερμοκρασίας 4 ^{o}C
- Νέα φυγοκέντρηση 5000 g, 5 min
- Επαναδιάλυση σε 12 ml σορβιτόλης 1 M, θερμοκρασίας 4 ^{o}C
- Φυγοκέντρηση 5000 g, 5 min
- Τελική επαναδιάλυση των κυττάρων σε σορβιτόλη 1 M, θερμοκρασίας 4 ^{o}C έως τελικού όγκου1,5 ml
- Άμεση χρήση των κυττάρων. Τα κύτταρα από την συγκεκριμένη διαδικασία δεν αποθηκεύονται προς μελλοντική χρήση

3.3.9.4. Μετασχηματισμός κυττάρων Pichia pastoris με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)

Τα κύτταρα που προετοιμάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε μετασχηματισμούς μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation), όπως περιγράφεται ακολούθως :

- Ανάμιξη 80 μl επιδεκτικών κυττάρων Pichia pastoris με το γραμμικό πλασμίδιο και ήπια ανάδευση με πιπέτα. Μεταφορά σε ειδική κυβέτα για ηλεκτροδιάτρηση και επώαση στον πάγο για 5 min
- Μεταφορά της κυψελίδας στην συσκευή ηλεκτροδιάτρησης GENE PULSER της BIORAD και εφαρμογή του ηλεκτρικού παλμού
- Άμεση προσθήκη 1 ml παγωμένης σορβιτόλης 1M και μεταφορά του διαλύματος σε αποστειρωμένο σωληνάριο. Επώαση στους 30 ^{o}C για 2 h
- Εμβολιασμός σε τρυβλία YPDS που περιέχουν το αντιβιοτικό ζεοσίνη
- Επώαση στους 30 ^{o}C για 3-10 ημέρες μέχρι την εμφάνιση ανθεκτικών αποικιών

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα Πειραματικών Διαδικασιών

4.1 Μικροβιακή Αποικοδόμηση Υγρού Απόβλητου Ελαιουργείου με χρήση στελεχών βασιδιομυκήτων

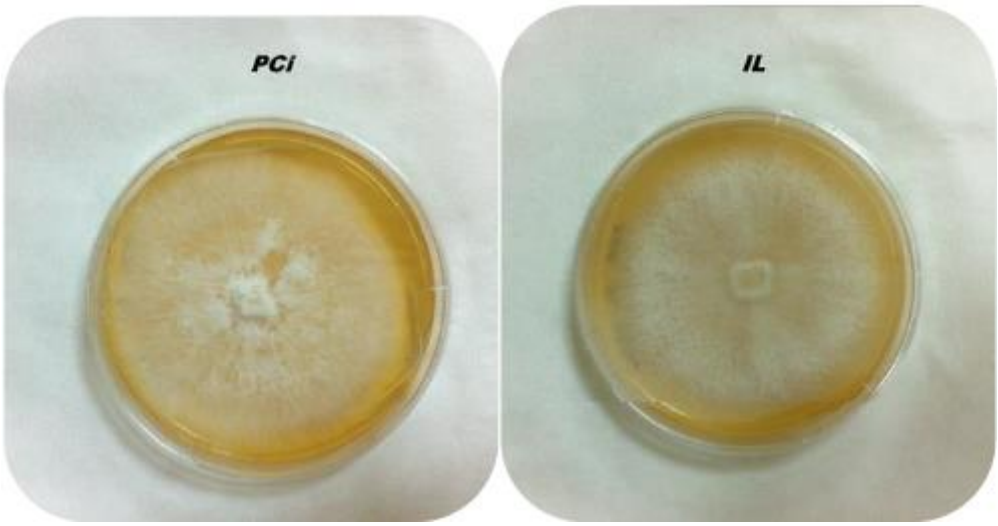
Το Υγρό Απόβλητο Ελαιουργείου, αφότου κατεργάστηκε, αναλύθηκε σχετικά με συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του και ως προς τη σύσταση του σε ενώσεις που χρησιμεύουν ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των εν λόγω μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων, παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί :

pH	5,95
Ολικές φαινόλες (ppm gallic acid)	3751,2
Αναγωγικά σάκχαρα (g/L)	24,8
Γλυκόζη (mg/mL)	15,3
Οπτική απορρόφηση στα 525 nm (Χρώμα)	42,3
Ολικές πρωτεϊνες (g/L)	3,2

Πίνακας 4.1: Σύσταση Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου σε θρεπτικά συστατικά και φυσικοχημικές ιδιότητες

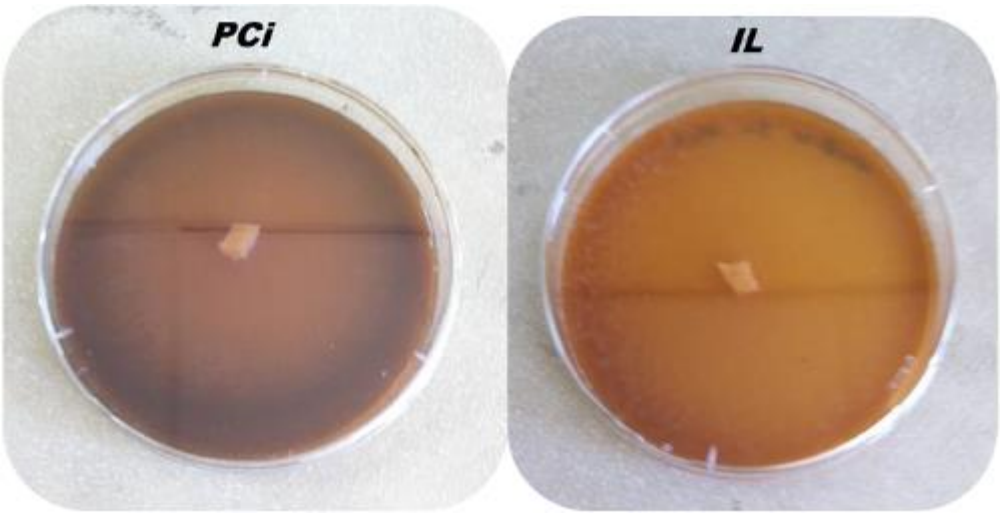
4.1.1. Στερεές Καλλιέργειες

Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών την 10η ημέρα επώασης τους, σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA.



Εικόνα 4.1: Ανάπτυξη στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (10η ημέρα επώασης)

Στις ακόλουθες εικόνες, παρατηρείται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Υγρό Απόβλητο Ελαιουργείου, την 15η ημέρα επώασης τους.



Εικόνα 4.2.: Ανάπτυξη στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα Υγρό Απόβλητο Ελαιουργείου (15η ημέρα επώασης)

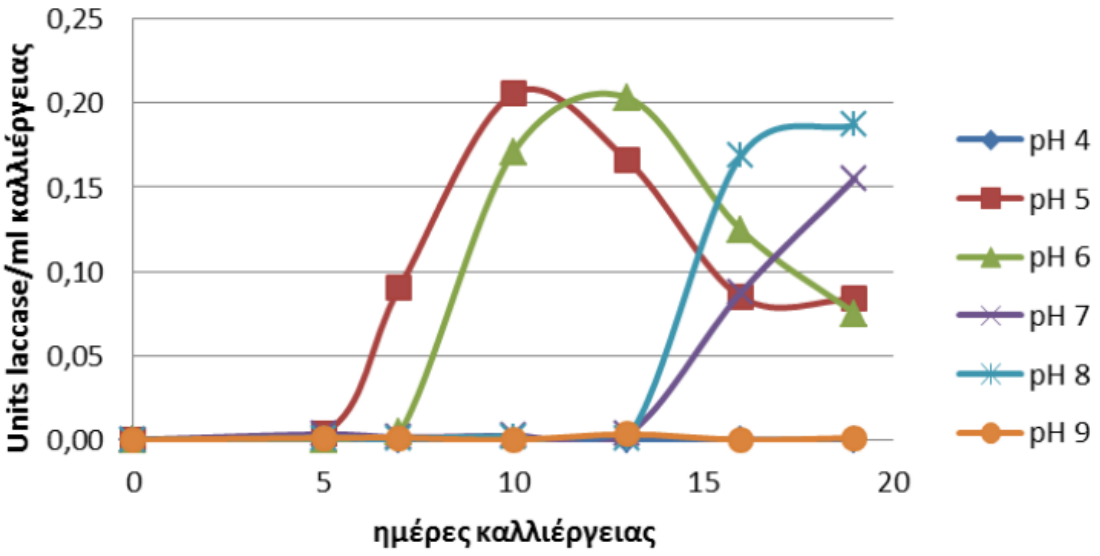
Όπως διακρίνεται και στις ανωτέρω εικόνες, τα επιλεγμένα στελέχη των βασιδιομυκήτων αποχρωματίζουν το Υγρό Απόβλητο Ελαιουργείου, γεγονός που αποδεικνύει την ικανότητα τους στην αποικοδόμηση των φαινολών του αποβλήτου.

4.2. Εύρεση Βέλτιστου pH καλλιέργειας

Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές διαδικασίες για την εύρεση του βέλτιστου pH για την καλλιέργεια του κάθε στελέχους. Έτσι, αναπτύχθηκαν μικροοργανισμοί σε ένα εύρος διαφορετικών pH, από αρχικό pH 4 μέχρι τελικό pH 9. Με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ρυθμίστηκε το κάθε pH στις καλλιέργειες και η επιλογή του βέλτιστου pH έγινε με κριτήρια (i) την ενεργότητα, (ii) την παραγώμενη βιομάζα, (iii) τη διάσπαση των φαινολικών ενώσεων και (iv) τον αποχρωματισμό του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου.

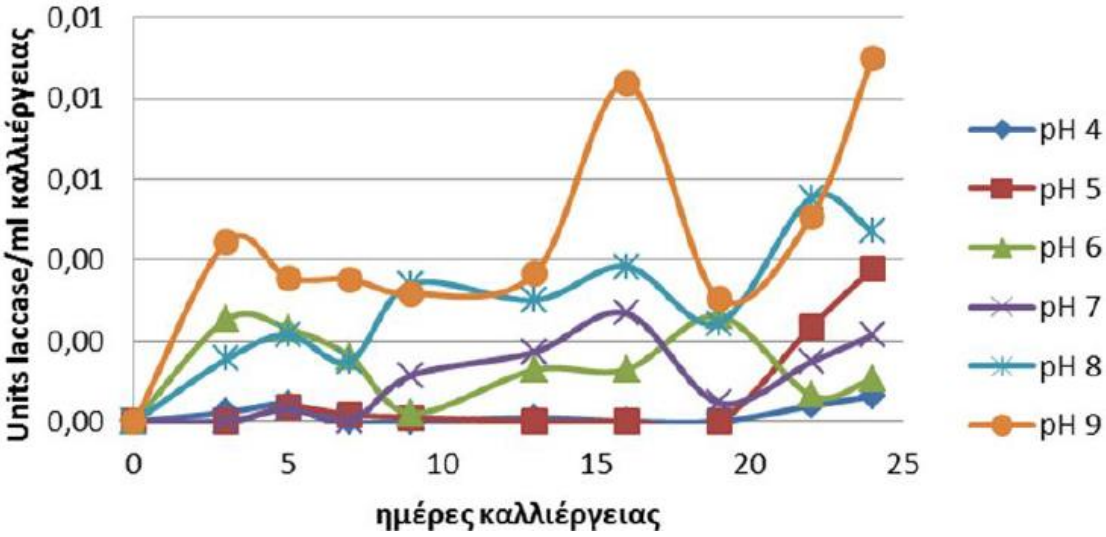
4.2.1.Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης

Η μεταβολή της ενεργότητας της λακκάσης κατά την καλλιέργεια του κάθε στελέχους παρουσιάζεται στα κατώθι διαγράμματα, με την τιμή που παραθέτεται να προκύπτει από το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.



Διάγραμμα 4.1: Ενεργότητα λακκάσης στο στέλεχος P. Citrinopileatus

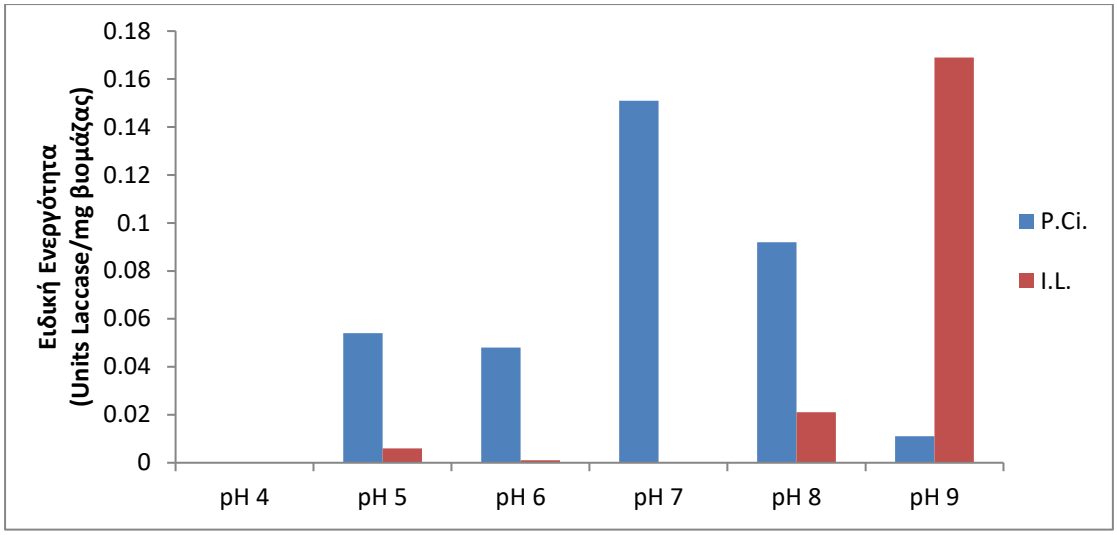
Για τιμές pH 4 και 9 δεν παρατηρήθηκε ενεργότητα λακκάσης στον ανωτέρω μύκητα, ενώ εμφάνισε υψηλά επίπεδα ενεργότητας στα pH 5 και 6.



Διάγραμμα 4.2: Ενεργότητα λακκάσης στο στέλεχος I. Lacteus

Η μέγιστη ενεργότητα για τον ανωτέρω μύκητα παρατηρήθηκε σε τιμές pH 9, ενώ υψηλές τιμές παρουσιάστηκαν και για pH 8 και pH 5.

Συγχρόνως, στον πίνακα και το διάγραμμα που βρίσκονται αμέσως παρακάτω, παρουσιάζονται οι τιμές ενεργότητας των δύο στελεχών στο τέλος της καλλιέργειας τους. Ως ειδική ενζυμική ενεργότητα ορίζεται η ενζυμική ενεργότητα ανά mg ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 4.3: Ειδική ενζυμική ενεργότητα λακκάσης

pH	P. Citrinopileatus	I. Lacteus
4	0,000	0,000
5	0,054	0,006
6	0,048	0,001
7	0,151	0,000
8	0,092	0,021
9	0,011	0,169

Πίνακας 4.1: Ειδική ενζυμική ενεργότητα λακκάσης (U mg^{-1})

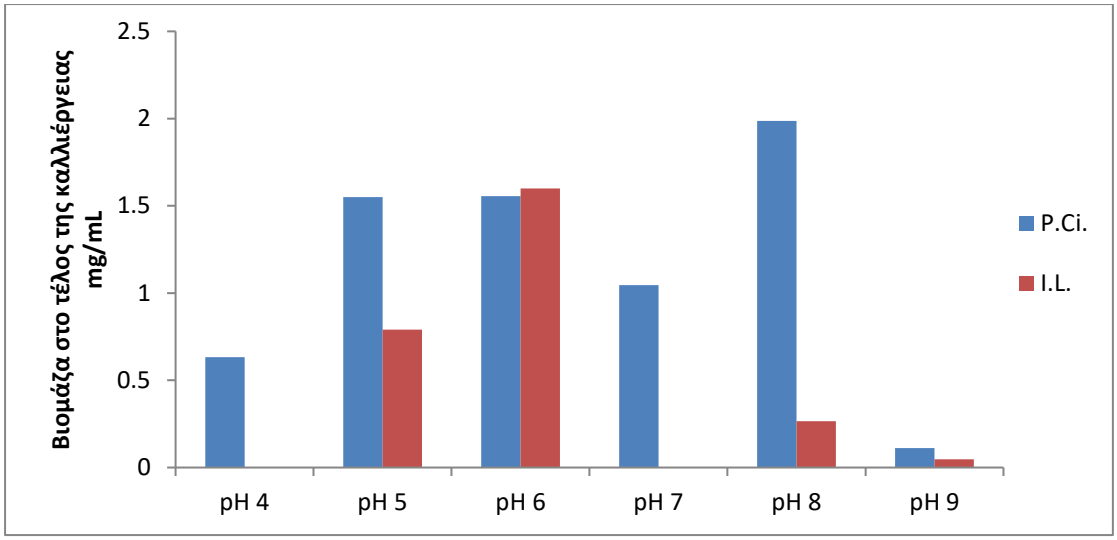
Σε ό,τι αφορά τον μύκητα P. Citrinopileatus, εμφανίζει υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα λακκάσης για τιμή pH 7, ενώ αντίστοιχα ο I. Lacteus παρουσιάζει μεγαλύτερη ενεργότητα για τιμή pH 9.

4.2.2. Μετρήσεις βιομάζας

Η βιομάζα που παράχθηκε από κάθε καλλιέργεια παρουσιάζεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα και το αντίστοιχο διάγραμμα. Παρατηρούμε πως το στέλεχος I. Lacteus είχε μεγαλύτερες τιμές βιομάζας για τιμές pH 6, ενώ το στέλεχος P. Citrinopileatus για τιμές pH 5, 6, και 7.

pH	P. Citrinopileatus	I. Lacteus
4	0,633	0,000
5	1,55	0,791
6	1,556	1,599
7	1,045	0,000
8	1,987	0,266
9	0,111	0,048

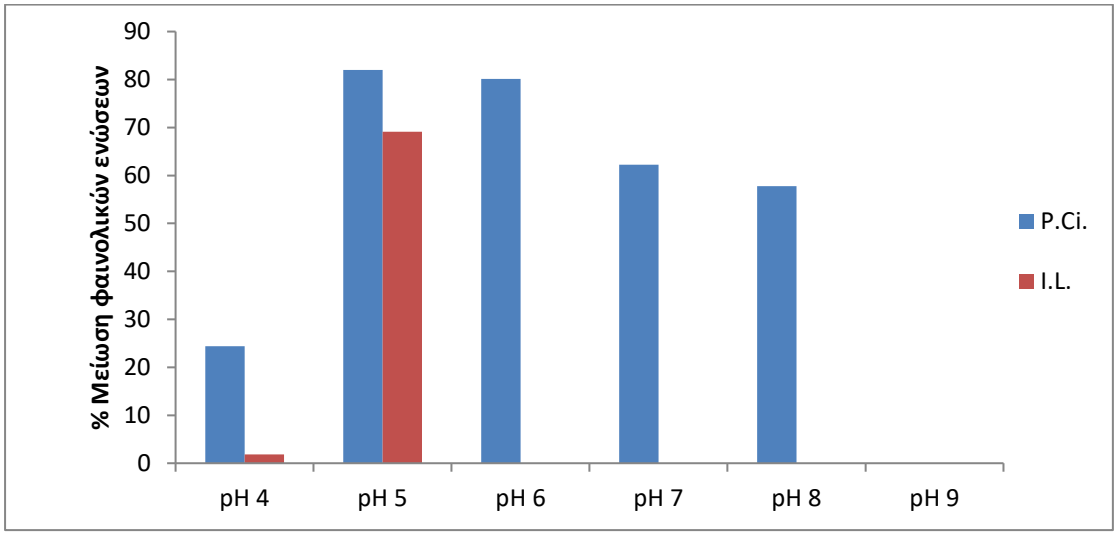
Πίνακας 4.2: Βιομάζα στελεχών στο τέλος της καλλιέργειας (mg mL^{-1})



Διάγραμμα 4.3: Βιομάζα στελεχών στο τέλος της καλλιέργειας (mg mL^{-1})

4.2.3. Μέτρηση φαινολικών ενώσεων

Η μέθοδος Folin – Ciocalteau ήταν εκείνη που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα. Έτσι, το ποσοστό της μείωσης της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων σε διαφορετικές τιμές pH παρουσιάζεται παρακάτω αναλυτικότερα, στον πίνακα και το αντίστοιχο με αυτόν διάγραμμα.



Διάγραμμα 4.4: Επί τοις εκατό μείωση φαινολικών ενώσεων στο κάθε στέλεχος

Παρατηρούμε πως το στέλεχος P. Citrinopileatus κατάφερε μείωση των φαινολικών ενώσεων του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου σε ποσοστό άνω του 60%, σε τιμές pH από 5 έως 8. Από την άλλη, το στέλεχος I. Lacteus κατάφερε αποικοδόμηση του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου σε τιμή pH 5.

pH	P. Citrinopileatus	I. Lacteus
4	24,41	1,82
5	81,98	69,12
6	80,13	0
7	62,24	0
8	57,76	0
9	0	0

Πίνακας 4.3: Επί τοις εκατό μείωση φαινολικών ενώσεων στο κάθε στέλεχος

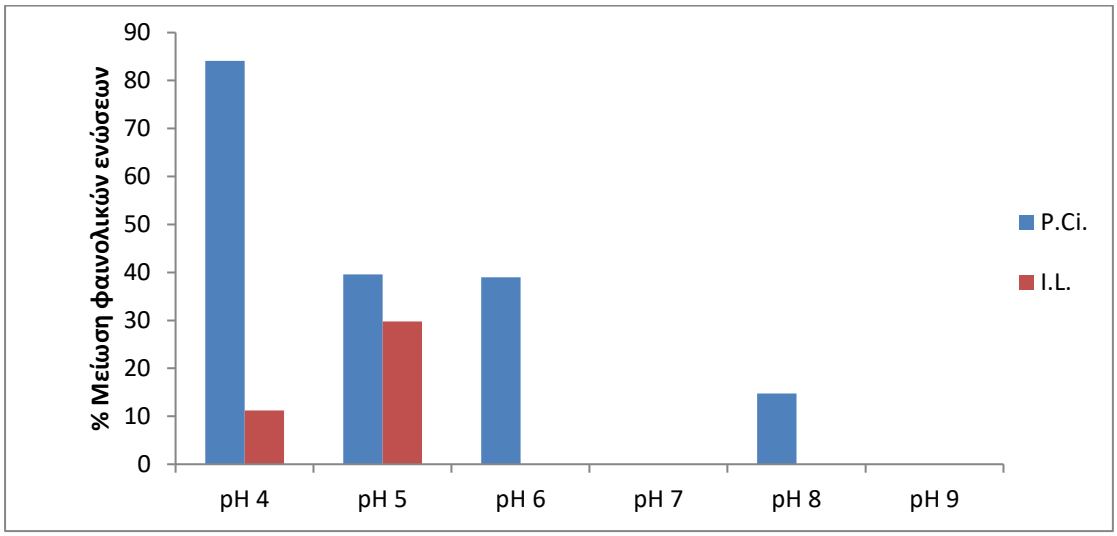
4.2.4. Αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου

Στον πίνακα που ακολουθεί και το αντίστοιχο διάγραμμα, παραθέτεται το ποσοστό αποχρωματισμού του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου για καθεμία από τις τιμές pH από 4 έως και 9.

pH	P. Citrinopileatus	I. Lacteus
4	84,11	11,21
5	39,56	29,78
6	38,98	0
7	0	0
8	14,78	0
9	0	0

Πίνακας 4.4: Επί τοις εκατό αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου από τα αντίστοιχα στελέχη

Παρατηρούμε πως για τιμές pH 4, το στέλεχος P. Citrinopileatus επιτυγχάνει υψηλότερα ποσοστά αποχρωματισμού του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου, ενώ για το I. Lacteus, το υψηλότερο ποσοστό αποχρωματισμού επιτυγχάνεται για τιμές pH 5.



Διάγραμμα 4.5: Επί τοις εκατό αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου από τα αντίστοιχα στελέχη

4.3. Βέλτιστος ρυθμός ανάδευσης καλλιέργειας

Εξετάστηκε ο βέλτιστος ρυθμός ανάδευσης για την καλλιέργεια καθενός από τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, σε τρεις διαφορετικές συνθήκες:

- 0 rpm
- 75 rpm
- 150 rpm

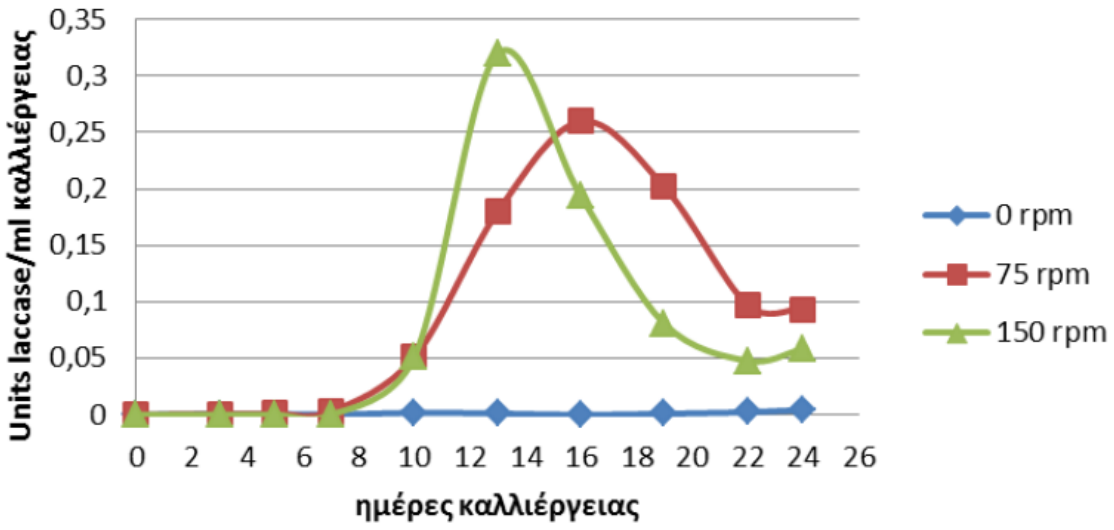
Η καλλιέργεια του κάθε στελέχους έγινε στο βέλτιστο pH που προσδιορίστηκε και φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Στέλεχος	pH
P.Citrinopileatus	6
I.Lacteus	5

Πίνακας 4.5: Βέλτιστο pH καλλιέργειας για κάθε ένα από τα μελετώμενα στελέχη

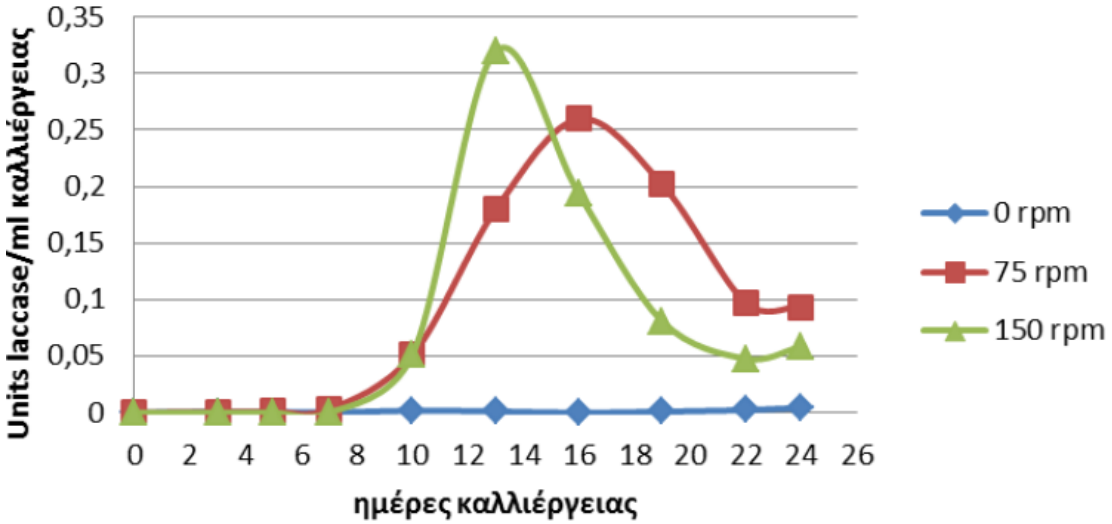
4.3.1. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης

Η μεταβολή της ενεργότητας της λακκάσης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας καθενός στελέχους παρουσιάζεται στα παρακάτω διαγράμματα:



Διάγραμμα 4.6: Ενεργότητα λακκάσης στο στέλεχος P. Citrinopileatus

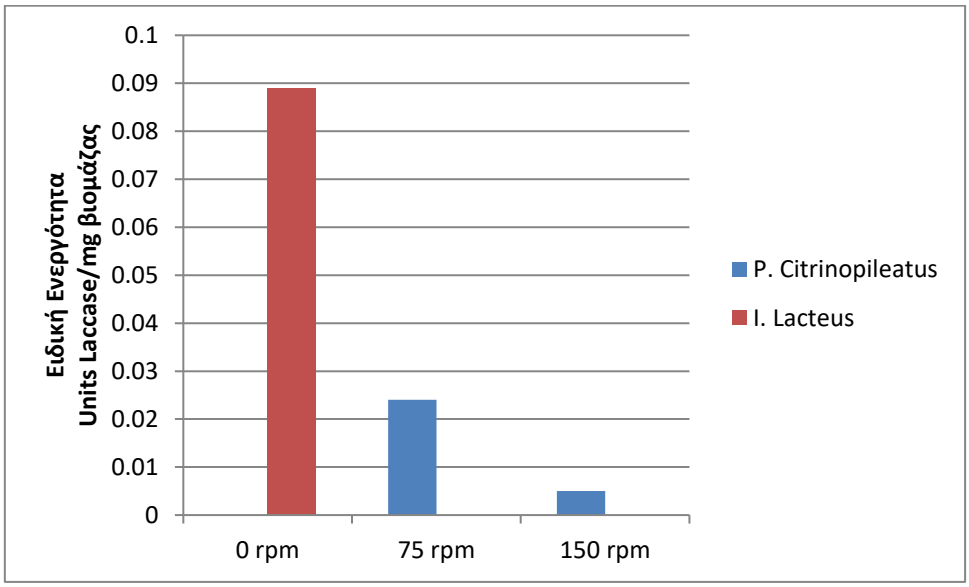
Ο μύκητας P. Citrinopileatus παρουσίασε υψηλή ενεργότητα λακκάσης για τις 75 και τις 150 rpm. Με απουσία ανάδευσης (0 rpm) το εξεταζόμενο στέλεχος δεν αναπτύχθηκε αρκούντως ώστε να παραχθεί το ζητούμενο ένζυμο.



Διάγραμμα 4.7: Ενεργότητα λακκάσης στο στέλεχος I. Lacteus

Ο μύκητας I. Lacteus εμφάνισε μια ελαφριά προτίμηση στην ανάδευση στις 75 rpm, χωρίς ωστόσο να υπάρχει ιδιαίτερη μεταβολή της ενεργότητας της λακκάσης σε αυτή από ότι στις υπόλοιπες (0 rpm και 150 rpm) συνθήκες.

Στο παρακάτω διάγραμμα και τον πίνακα του εξετάζεται η ειδική ενεργότητα των δύο στελεχών στο τέλος της διαδικασίας καλλιέργειας τους.



Διάγραμμα 4.8: Ειδική ενεργότητα λακκάσης στα εξεταζόμενα στελέχη

Δείγμα	P. Citrinopileatus	I. Lacteus
0 rpm	0	0,089
75 rpm	0,024	0
150 rpm	0,005	0

Πίνακας 4.6: Ειδική ενεργότητα λακκάσης στα εξεταζόμενα στελέχη

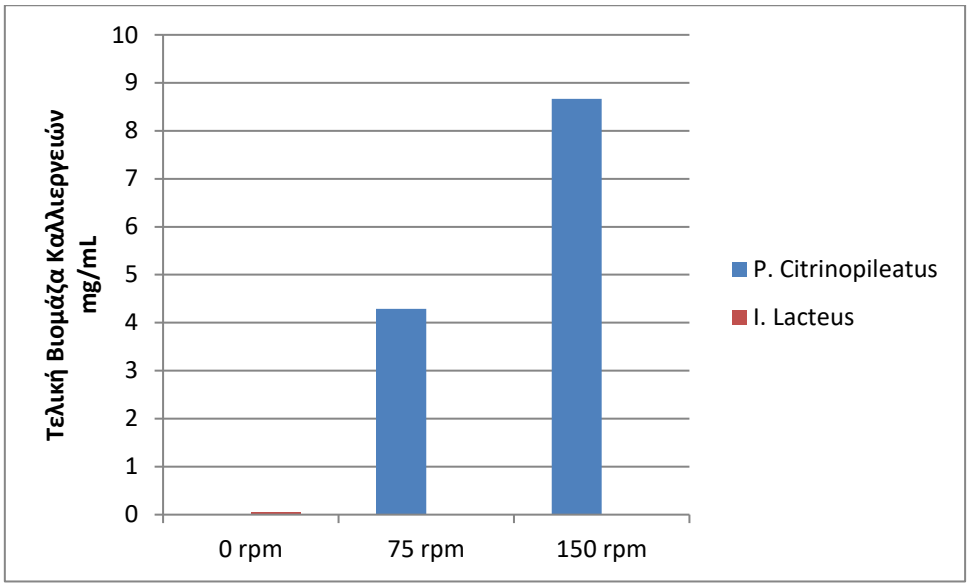
4.3.2. Μετρήσεις Βιομάζας

Το βάρος της βιομάζας που παράχθηκε σε κάθε περίπτωση, παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα:

Δείγμα	P. Citrinopileatus	I. Lacteus
0 rpm	0	0,043
75 rpm	4,287	0
150 rpm	8,667	0

Πίνακας 4.7: Τελική βιομάζα καλλιεργειών (mg/mL)

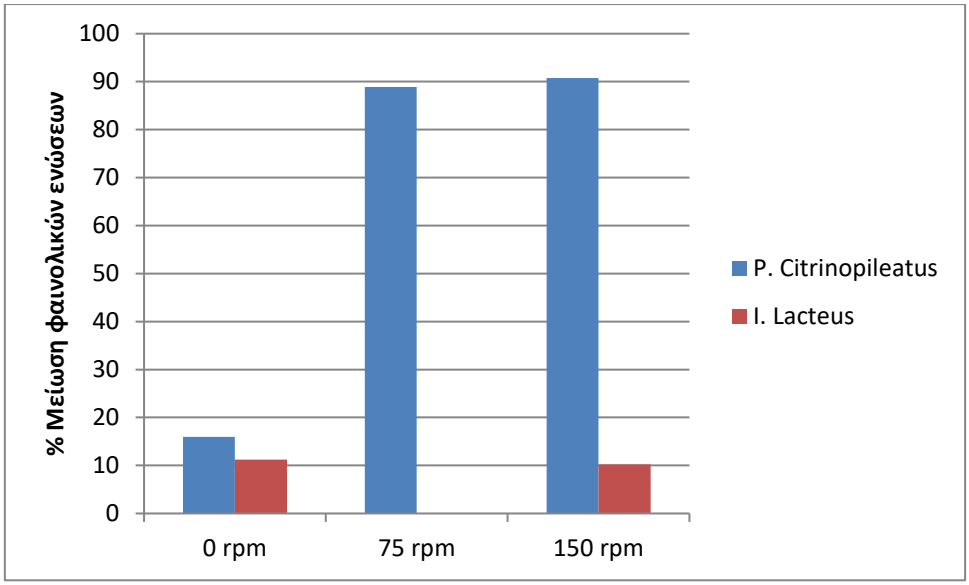
Το στέλεχος P. Citrinopileatus παρήγαγε μεγαλύτερο ποσό βιομάζας στις 150 rpm, όπου κι εμφάνισε και την υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης. Το στέλεχος I. Lacteus έδωσε ορισμένη ποσότητα βιομάζας στην περίπτωση της μη ανάδευσης (0 rpm).



Διάγραμμα 4.9: Τελική βιομάζα καλλιεργειών (mg/mL)

4.3.3. Φαινολικές ενώσεις – Μετρήσεις

Η μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων για το καθένα από τα δύο στελέχη και την αντίστοιχη καλλιέργεια του παρατίθεται αναλυτικά στους ακόλουθους πίνακες και τα διαγράμματα εκείνων.



Διάγραμμα 4.10: Επί τοις εκατό μείωση φαινολικών ενώσεων από τα αντίστοιχα στελέχη

Η μέγιστη ποσοστιαία αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε από το στέλεχο P. Citrinopileatus όταν εκείνος καλλιεργήθηκε υπό συνθήκες ανάδευσης, με βέλτιστα αποτελέσματα στις 150 rpm.

Δείγμα	P. Citrinopileatus	I. Lacteus
0 rpm	15,98	11,23
75 rpm	88,89	0
150 rpm	90,76	10,23

Πίνακας 4.8: Επί τοις εκατό μείωση φαινολικών ενώσεων από τα αντίστοιχα στελέχη

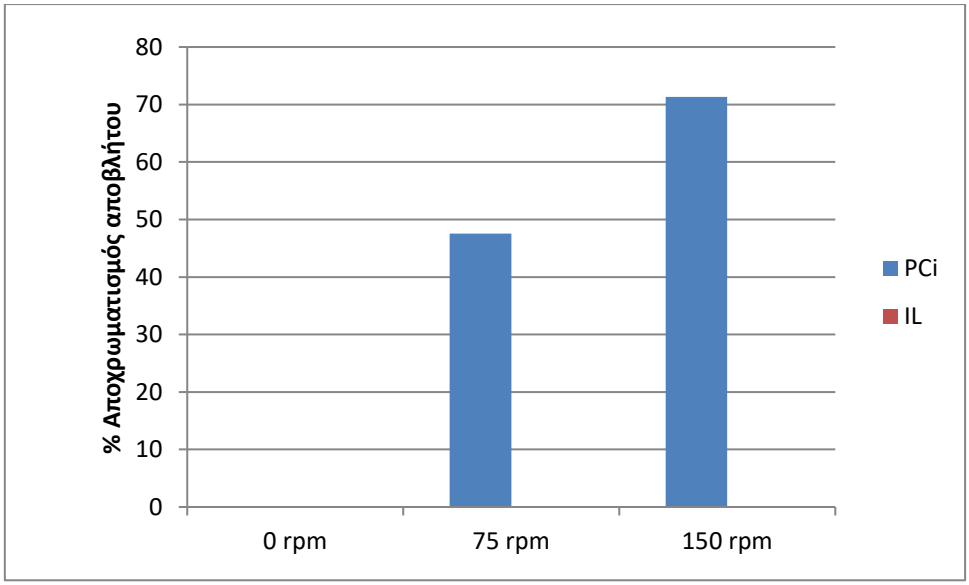
4.3.4. Αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου

Ο ποσοστιαίος αποχρωματισμός του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου για καθένα από τα δύο εξεταζόμενα στελέχη παρατίθεται ακολούθως, στον πίνακα που ακολουθεί και το αντίστοιχο διάγραμμα του.

Δείγμα	P. Citrinopileatus	I. Lacteus
0 rpm	0	0
75 rpm	47,55	0
150 rpm	71,34	0

Πίνακας 4.9: Επί τοις εκατό αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου

Ο μύκητας P. Citrinopileatus αποχρωμάτισε σε μεγάλο ποσοστό το Υγρό Απόβλητο Ελαιουργείου όταν καλλιεργήθηκε στις 75 και 150 rpm. Στις υπόλοιπες καλλιέργειες δεν πραγματοποιήθηκε αποχρωματισμός του.



Διάγραμμα 4.11: Επί τοις εκατό αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου

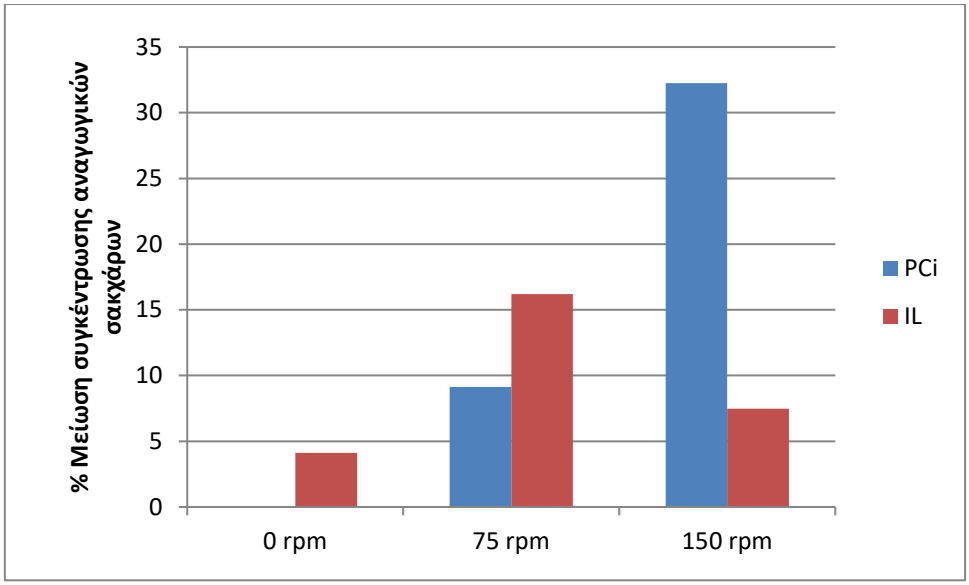
4.3.5. Αναγωγικά σάκχαρα – Μετρήσεις

Καθώς το Υγρό Απόβλητο Ελαιουργείου είναι πλούσιο σε σάκχαρα, τα οποία, εν αντιθέσει με τις φαινολικές ενώσεις, χρησιμοποιούνται ευρέως ως πηγή ενέργιας των διαφόρων μικροοργανισμών, η μέτρηση τους κρίνεται αναγκαία. Έτσι, εθεωρείτο πως η αυξανόμενη βιομάζα των μικροοργανισμών έχει άμεση σχέση με την κατανάλωση σακχάρων και την ακόλουθη διάσπαση των φαινολών, οπότε κι έγινε ποσοτικοποίηση των αναγωγικών σακχάρων με τη DNS διαδικασία.

Δείγμα	P. Citrinopileatus	I. Lacteus
0 rpm	0	4,12
75 rpm	9,14	16,21
150 rpm	32,24	7,49

Πίνακας 4.9: Επί τοις εκατό μείωση αναγωγικών σακχάρων

Παρατηρούμε πως το στέλεχος P. Citrinopileatus εμφάνισε μεγαλύτερη μείωση των αναγωγικών σακχάρων του σε συνθήκες ανάδευσης στις 150 rpm. Από την άλλη, το στέλεχος I. Lacteus παρουσίασε μικρά ποσοστά μείωσης σε όλες τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν, με μεγαλύτερα ποσοστά στις 75 rpm.



Διάγραμμα 4.12: Επί τοις εκατό μείωση αναγωγικών σακχάρων

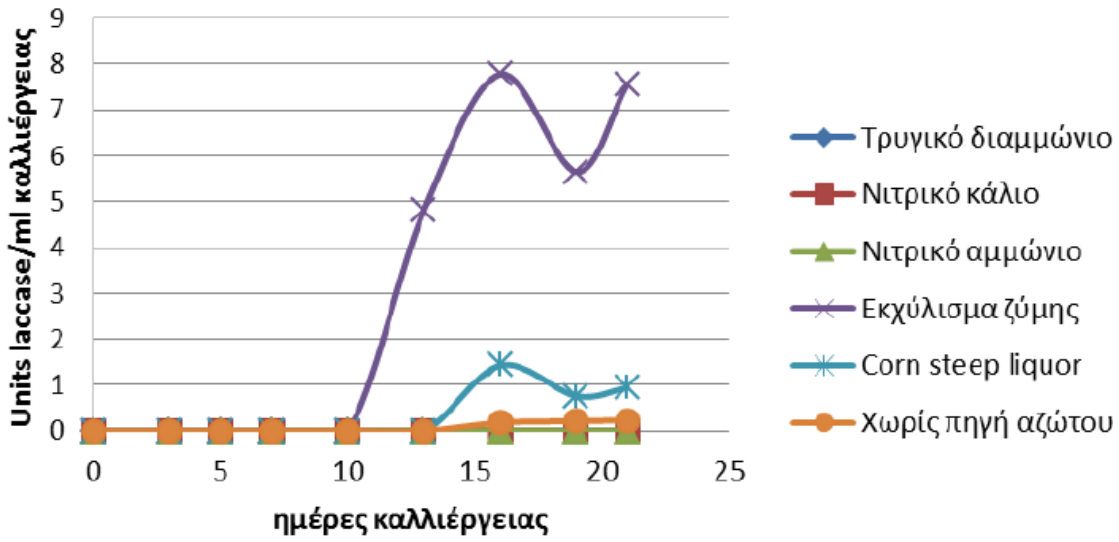
4.4. Βέλτιση πηγή αζώτου – Εύρεση και μετρήσεις

Η διάφορες πηγές αζώτου επηρεάζουν σαφώς την ανάπτυξη και τη λιγνινολυτική δράση των εξεταζόμενων μικροοργανισμών. Έτσι, εξετάστηκαν οι παρακάτω πηγές αζώτου:

- Νιτρικό Κάλιο (KVO_3)
- Τρυγικό Διαμμώνιο ($C_4H_{12}N_2O_6$)
- Νιτρικό Αμμώνιο (NH_4NO_3)
- Εκχύλισμα Ζύμης (Yeast extract)
- Σιρόπι καλαμποκιού (Corn steep liquor)

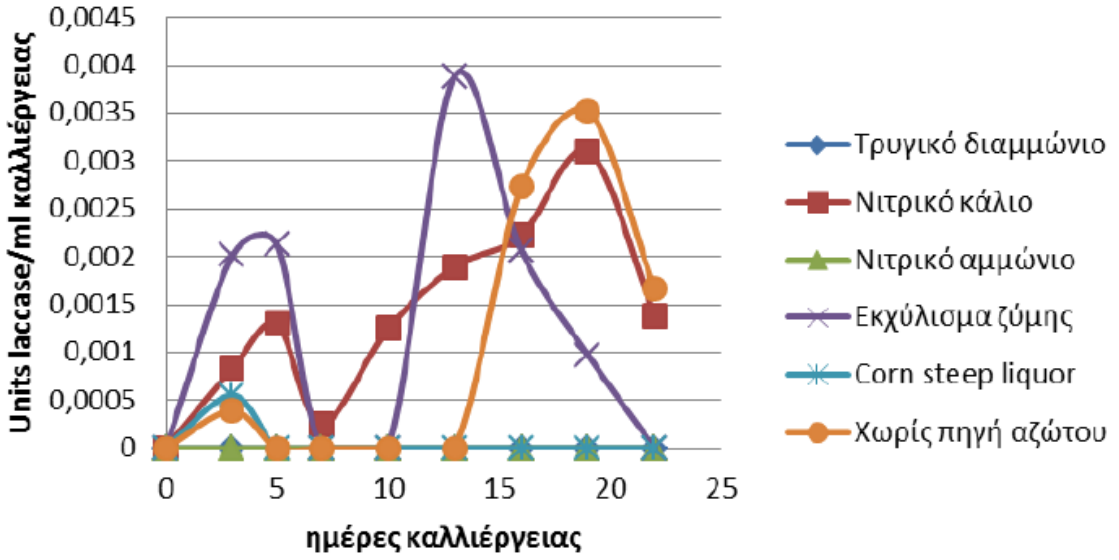
4.4.1. Ενζυμική ενεργότητα λακκάσης – Μετρήσεις

Εξετάστηκε η επίδραση του υποστρώματος στην ενεργότητα της λακκάσης σε όλο το χρόνο καλλιέργειας του εκάστοτε στελέχους, με τα αποτελέσματα να παρατίθενται αναλυτικά στα διαγράμματα που ακολουθούν.



Διάγραμμα 4.13: Ενεργότητα λακκάσης για το στέλεχος P. Citrinopileatus και για το εκάστοτε θρεπτικό συστατικό

Το στέλεχος P. Citrinopileatus παρουσιάζει ξεκάθαρη προτίμηση στο εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), ενώ θετικά αποτελέσματα είχαμε και στις περιπτώσεις των θρεπτικών με σιρόπι καλαμποκιού (corn steep liquor)



Διάγραμμα 4.14: Ενεργότητα λακκάσης για το στέλεχος I. Lacteus και για το εκάστοτε θρεπτικό συστατικό

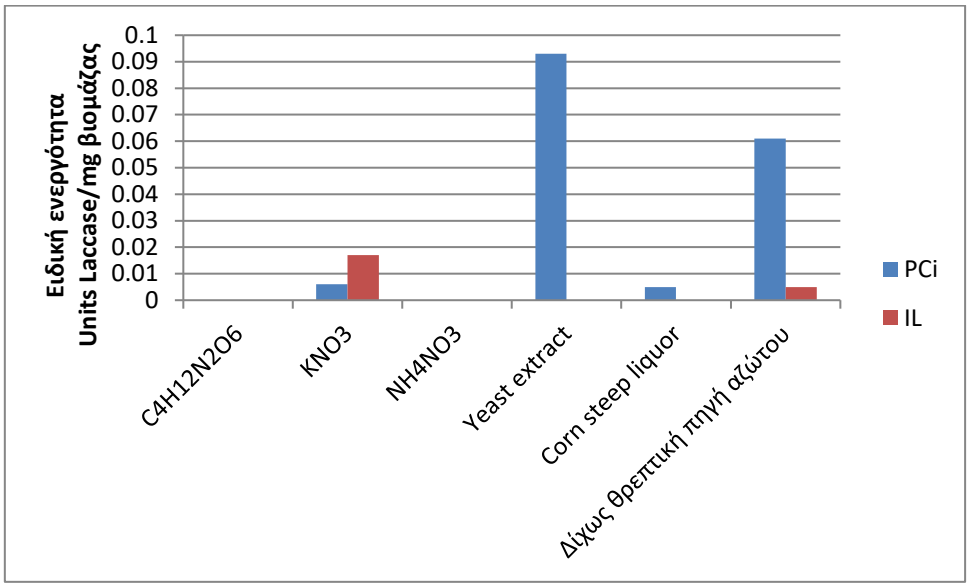
Παρατηρούμε πως στο στέλεχος I. Lacteus, δεν εμφανίζεται κάποια ιδιαίτερη προτίμηση σε θρεπτικό συστατικό, αν και η ενεργότητα που παρουσίασε η κάθε περίπτωση είναι ιδιαιτέρως μικρή.

Ακολούθως, παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που αφορούν την ειδική ενεργότητα των στελεχών, όπως εκείνα βρέθηκαν με την ολοκλήρωση των

καλλιεργειών. Ως ειδική ενζυμική ενεργότητα θεωρείται η ενζυμική ενεργότητα ανά mg ξηρής βιομάζας.

Δείγμα	P. Citrinopileatus	I. Lacteus
$C_4H_{12}N_2O_6$	0	0
KVO_3	0,006	0,017
NH_4NO_3	0	0
Yeast extract	0,093	0
Corn steep liquor	0,005	0
Δίχως θρεπτική πηγή αζώτου	0,061	0,005

Πίνακας 4.10: Ειδική ενζυμική ενεργότητα (U/mg) ανά περίπτωση στελέχους και θρεπτικού συστατικού



Διάγραμμα 4.15: Ειδική ενζυμική ενεργότητα (U/mg) ανά περίπτωση στελέχους και θρεπτικού συστατικού

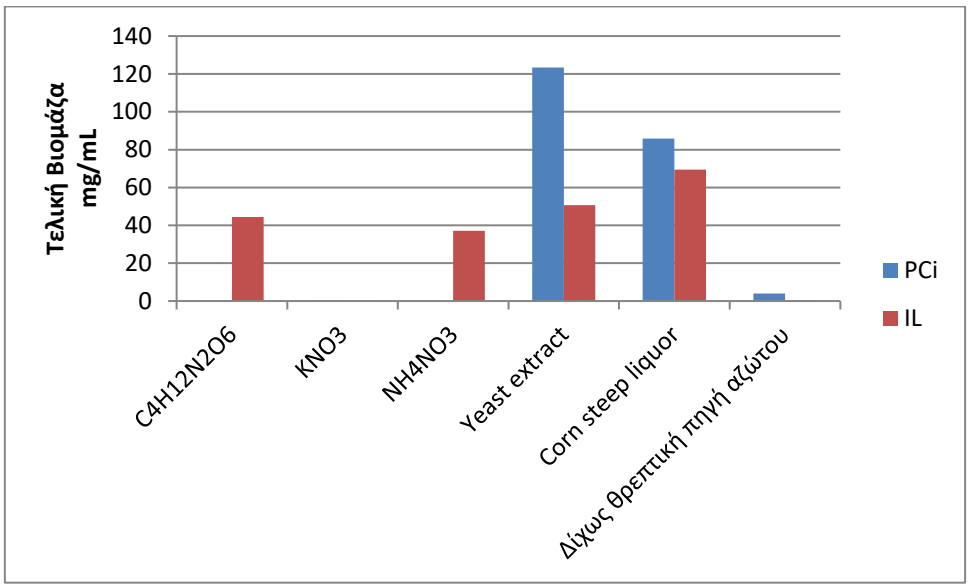
4.4.2. Βιομάζα – Μετρήσεις

Τα αποτελέσματα της παραγωγής βιομάζας από καθεμιά καλλιέργεια παρατίθενται ακολούθως.

Δείγμα	PCi	IL
$C_4H_{12}N_2O_6$	0,225	44,322
KVO_3	0,387	0,092
NH_4NO_3	0	37,126
Yeast extract	123,412	50,674
Corn steep liquor	85,771	69,414
Δίχως θρεπτική πηγή αζώτου	3,915	0,411

Πίνακας 4.11: Τελική βιομάζα ανά περίπτωση στελέχους και θρεπτικού συστατικού (mg/mL)

Διαπιστώνεται πως το στέλεχος P. Citrinopileatus αναπτύχθηκε σαφώς παραπάνω στις περιπτώσεις καλλιέργειας του με θρεπτική πηγή αζώτου σιρόπι καλαμποκιού (corn steep liquor) και εκχύλισμα ζύμης (yeast extract). Από την άλλη, το στέλεχος I. Lacteus αναπτύχθηκε περισσότερο στην περίπτωση θρεπτικής πηγής αζώτου τα corn steep liquor, yeast extract και το τρυγικό διαμμώνιο.



Διάγραμμα 4.16: Τελική βιομάζα ανά περίπτωση στελέχους και θρεπτικού συστατικού (mg/mL)

Εικόνες 4.1 – 4.2: Βιομάζα στελέχους P. Citrinopileatus, με θρεπτική πηγή αζώτου yeast extract (αριστερά) και corn steep liquor (δεξιά)

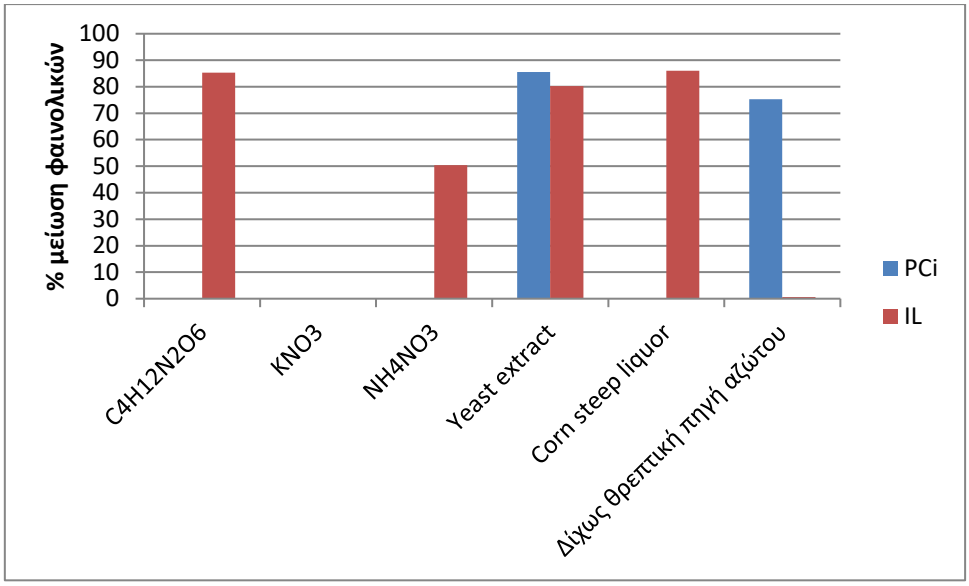
4.4.3. Φαινολικές ενώσεις – Μετρήσεις

Μας ενδιαφέρει το ποσοστό μείωσης των φαινολικών ενώσεων ως προς τη συγκέντρωση τους, με τα παρακάτω διαγράμματα και πίνακες να δείχνουν τη μείωση για κάθε στέλεχος.

Δείγμα	PCi	IL
$C_4H_{12}N_2O_6$	0	85,36
KVO_3	0	0
NH_4NO_3	0	50,44
Yeast extract	85,54	80,21
Corn steep liquor	86, 47	85,98
Δίχως θρεπτική πηγή αζώτου	75,32	0,61

Πίνακας 4.12: Επί τοις εκατό μείωση φαινολικών ενώσεων ανά περίπτωση

Σε ό,τι αφορά το στέλεχος P. Citrinopileatus, διαπιστώθηκε πως σε καλλιέργειες με θρεπτική πηγή αζώτου yeast extract και corn steep liquor, αλλά και δίχως θρεπτική πηγή, καταφέρνει διάσπαση φαινολικών σε ποσοστά άνω του 75%. Από την άλλη, το στέλεχος I. Lacteus επιτυγχάνει μεγαλύτερη ποσοστιαία διάσπαση φαινολικών με θρεπτικές πηγές αζώτου το τρυγικό διαμμώνιο, το εκχύλισμα ζύμης και το σιρόπι καλαμποκιού καταρχάς (και ποσοστά άνω του 80%) και το νιτρικό αμμώνιο δευτερευόντως.



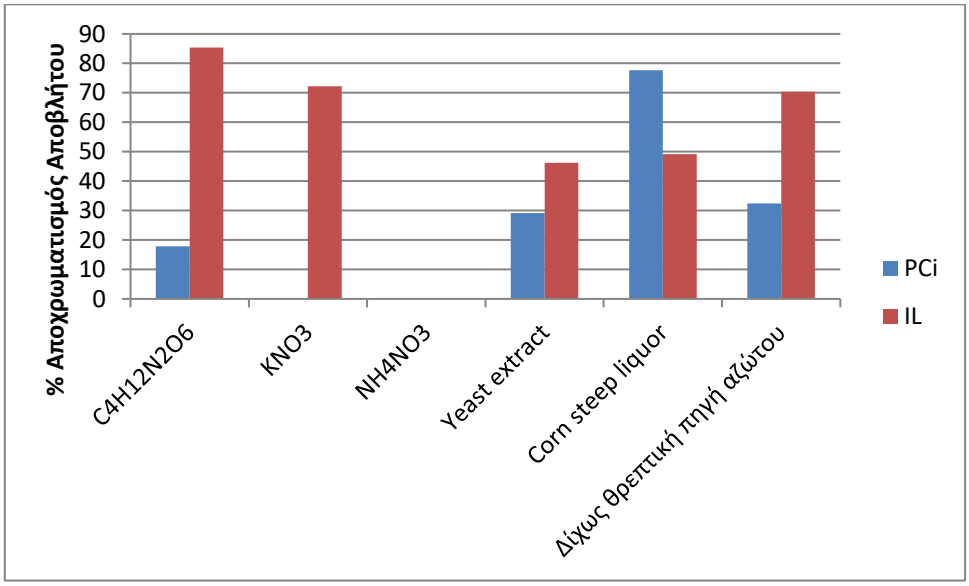
Διάγραμμα 4.17: Επί τοις εκατό μείωση φαινολικών ενώσεων ανά περίπτωση

4.4.4. Αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου

Δείγμα	PCi	IL
$C_4H_{12}N_2O_6$	17,88	85,36
KVO_3	0	72,19
NH_4NO_3	0	0
Yeast extract	29,13	46,24
Corn steep liquor	77,65	49,12
Δίχως θρεπτική πηγή αζώτου	32,48	70,37

Πίνακας 4.13: Επί τοις εκατό αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου σε κάθε περίπτωση

Διαπιστώθηκε πως, παρουσία θρεπτικών πηγών αζώτου yeast extract και corn steep liquor, τα δύο στελέχη αποχρωματίζουν αρκούντως ικανοποιητικά το Υγρό Απόβλητο Ελαιουργείου, αν και με σημαντικές ποσοστιαίες διαφορές σε κάθε περίπτωση. Επιπλέον, στην περίπτωση που πηγή αζώτου είναι το τρυγικό διαμώννιο, παρατηρείται πως το στέλεχος I. Lacteus αποχρωματίζει το Απόβλητο σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό από ότι το στέλεχος P. Citrinopileatus, ενώ το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση μη ύπαρξης πηγής αζώτου.



Διάγραμμα 4.18: Επί τοις εκατό αποχρωματισμός Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου σε κάθε περίπτωση

4.4.5. Αναγωγικά σάκχαρα – Μετρήσεις

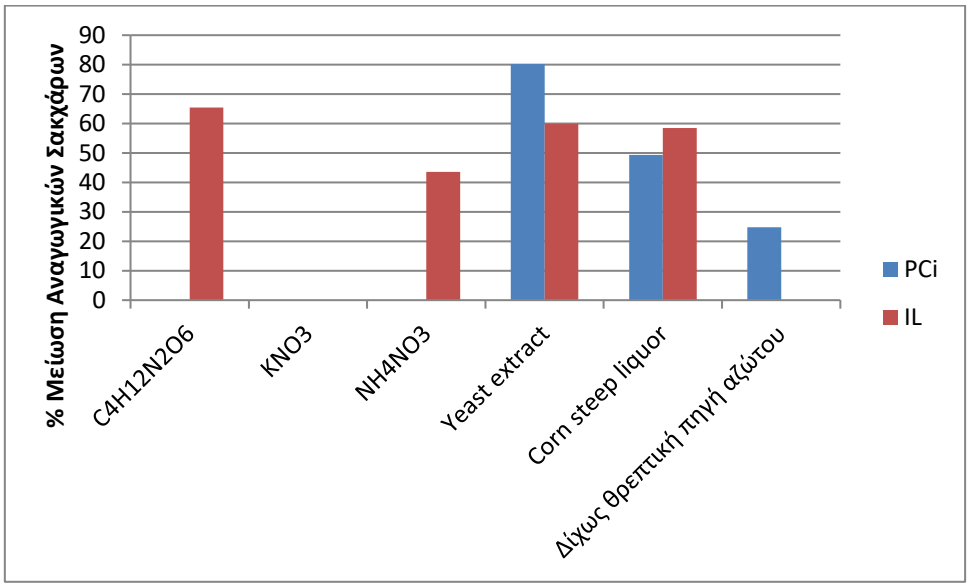
Διαπιστώθηκε μεγαλύτερη αποδοτικότητα σε ό,τι αφορά τη μείωση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων στην περίπτωση που η θρεπτική πηγή αζώτου υπήρξε το εκχύλισμα ζύμης και στις δύο περιπτώσεις στελεχών.

Δείγμα	PCi	IL
$C_4H_{12}N_2O_6$	0	65,46
KVO_3	0	0
NH_4NO_3	0	43,56
Yeast extract	80,23	59,89
Corn steep liquor	49,34	58,43
Δίχως θρεπτική πηγή αζώτου	24,78	0

Πίνακας 4.14: Επί τοις εκατό μείωση αναγωγικών σακχάρων ανά περίπτωση

Επιπλέον, σε ό,τι αφορά το στέλεχος P. Citrinopileatus, διαπιστώθηκε ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων και στις περιπτώσεις που υπήρξε ως θρεπτική πηγή το σιρόπι καλαμποκιού ή δεν υπήρξε καθόλου θρεπτική πηγή. Από την άλλη, το στέλεχος I. Lacteus εμφάνισε ανάλογη μείωση αναγωγικών

σακχάρων στις περισσότερες των περιπτώσεων θρεπτικών πηγών αζώτου, εξαιρώντας το νιτρικό κάλιο και την περίπτωση απουσίας θρεπτικής πηγής, όπου δεν υπήρξε μείωση.



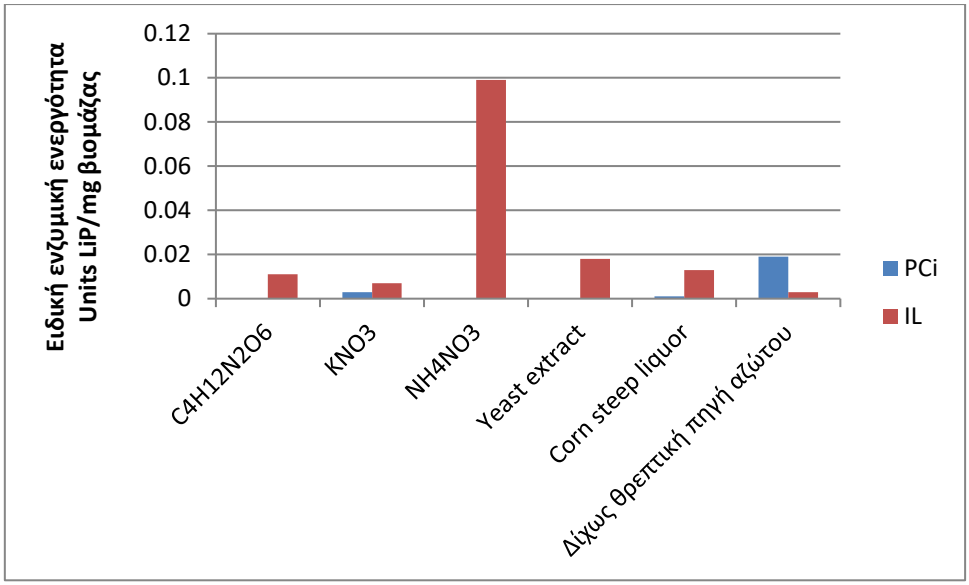
Διάγραμμα 4.19: Επί τοις εκατό μείωση αναγωγικών σακχάρων ανά περίπτωση

4.4.6. Ενζυμική ενεργότητα υπεροξειδάσης της λιγνίνης (LiP) – Μετρήσεις

Ως ειδική ενζυμική ενεργότητα θεωρείται η ενζυμική ενεργότητα ανά mg ξηρής βιομάζας. Στην προκειμένη, μας ενδιαφέρει η ειδική ενζυμική ενεργότητα που παρουσιάζουν τα δύο εξεταζόμενα στελέχη στις συνθήκες που τους έχουν επιβληθεί σε κάθε περίπτωση, όπου και, παρατηρώντας τα δεδομένα του παρακάτω πίνακα και του αντίστοιχου διαγράμματος, διαπιστώνουμε πως μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα παρουσιάζει το στέλεχος I. Lacteus όταν έχει καλλιεργηθεί με χρήση θρεπτικής πηγής αζώτου το νιτρικό αμμώνιο.

Δείγμα	PCi	IL
$C_4H_{12}N_2O_6$	0	0,011
KVO_3	0,003	0,007
NH_4NO_3	0	0,099
Yeast extract	0	0,018
Corn steep liquor	0,001	0,013
Δίχως θρεπτική πηγή αζώτου	0,019	0,003

Πίνακας 4.15: Ειδική ενζυμική ενεργότητα LiP (U/mg)



Διάγραμμα 4.20: Ειδική ενζυμική ενεργότητα LiP (U/mg)

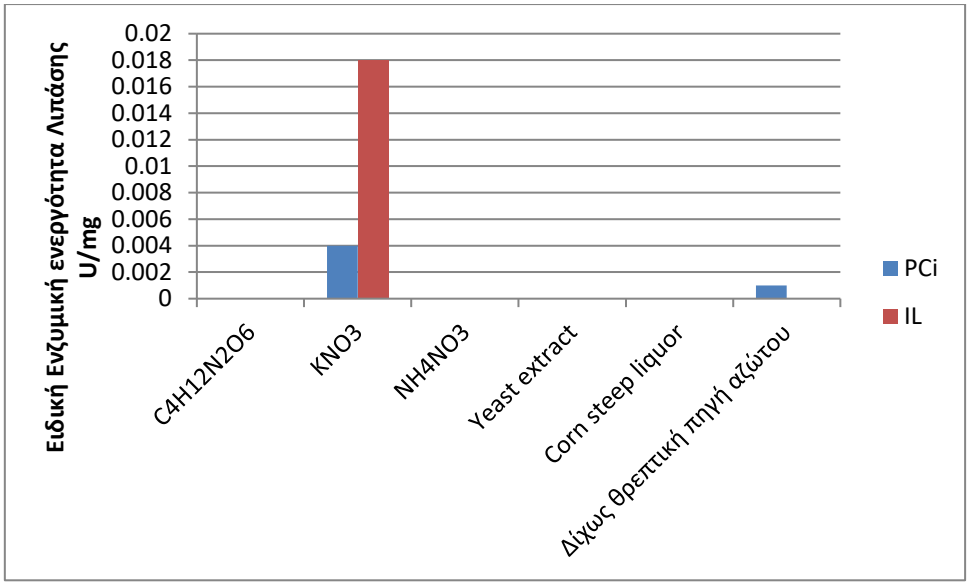
4.4.7. Ενζυμική ενεργότητα λιπάσης – Μετρήσεις

Η ειδική ενεργότητα της λιπάσης παρουσιάζεται στον πίνακα και το διάγραμμα που βρίσκονται παρακάτω ανά περίπτωση, διαπιστώνοντας πως μεγαλύτερη ειδική ενζυμική ενεργότητα παρουσιάζει το στέλεχος I. Lacteus στην περίπτωση της καλλιέργειας του παρουσιά θρεπτικής πηγής αζώτου το νιτρικό κάλιο.

Δείγμα	PCi	IL
$C_4H_{12}N_2O_6$	0	0
KVO_3	0,004	0,018
NH_4NO_3	0	0
Yeast extract	0	0
Corn steep liquor	0	0
Δίχως θρεπτική πηγή αζώτου	0,001	0

Πίνακας 4.16: Ειδική ενζυμική ενεργότητα λιπάσης (U/mg)

Ως ειδική ενζυμική ενεργότητα θεωρείται η ενζυμική ενεργότητα ανά mg ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 4.21: Ειδική ενζυμική ενεργότητα λιπάσης (U/mg)

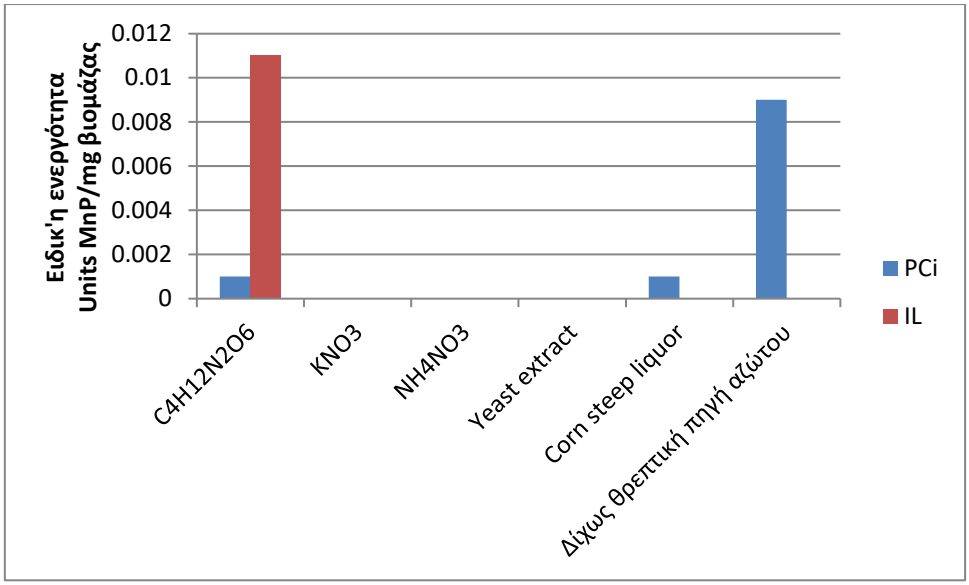
4.4.8 Ενζυμική ενεργότητα υπεροξειδάσης του Μαγγανίου – Μετρήσεις

Στο διάγραμμα και τον πίνακα παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ειδικής ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση του Μαγγανίου για κάθε στέλεχος στο τέλος των καλλιεργειών.

Δείγμα	PCi	IL
$C_4H_{12}N_2O_6$	0,001	0,011
KVO_3	0	0
NH_4NO_3	0	0
Yeast extract	0	0
Corn steep liquor	0,001	0
Δίχως θρεπτική πηγή αζώτου	0,009	0

Πίνακας 4.17: Ειδική ενζυμική ενεργότητα MnP ανά περίπτωση στελέχους και θρεπτικής πηγής αζώτου

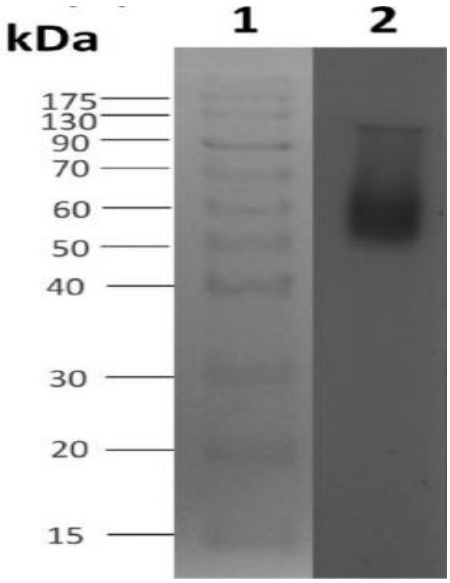
Η ειδική ενζυμική ενεργότητα ορίζεται ως η ενζυμική ενεργότητα ανά mg ξηρής βιομάζας. Επιπλέον, παρατηρούμε πως υψηλότερη ειδική ενεργότητα MnP παρουσιάζει το στέλεχος P. Citrinopileatus στην περίπτωση μη παρουσίας θρεπτικής πηγής αζώτου.



Διάγραμμα 4.22: Ειδική ενζυμική ενεργότητα MnP ανά περίπτωση στελέχους και θρεπτικής πηγής αζώτου

4.5 Ζυμογραφήματα

Ζυμογραφήματα πραγματοποιήθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιεργειών των υπό εξέταση στελεχών, με κατάλληλα υποστρώματα για την ανίχνευση ενζυμικών ενεργοτήτων λακκάσης.



Εικόνα 4.3: ζυμογράφημα για ενζυμική ενεργότητα λακκάσης, στο υπερκείμενο καλλιεργειών του P. Citrinopileatus (SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, 1: μάρτυρας μοριακών βαρών, 2: ανίχνευση ενεργότητας λακκάσης)

Σε ό,τι αφορά το στέλεχος του I. lacteus δεν ανιχνεύθηκαν ενζυμικές ενεργότητες. Στα υπερκείμενα των καλλιεργειών του P. Citrinopileatus ανιχνεύθηκε μια

πρωτεϊνική ζώνη με ενεργότητα λακκάσης και μοριακό βάρος περί τα 55 kDa. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ενζυμική ενεργότητα λακκάσης του P. citrinopileatus οφείλεται σε ένα μόνο ένζυμο, αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση να παράγονται επίσης και δευτερεύοντα ένζυμα με ενεργότητα λακκάσης.

4.6 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός της υπεροξειδάσης MtPerII του M. Thermophila

Το αξιοσημείωτο λιγνινοκυτταρινολυτικό δυναμικό του μύκητα M. thermophila σε συνδυασμό με το γονιδίωμά του, τον καθιστά σημαντική πηγή καινούριων λιγνινολυτικών ενζύμων με πιθανά νέες ιδιότητες, μεταξύ αυτών και θερμόφιλα ένζυμα με ποικίλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Ένα πλήθος εξωκυτταρικών πρωτεϊνών υπερεκφράζονται όταν ο οργανισμός αναπτύσσεται σε λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα, ανάμεσα σε αυτά και μια πρωτεϊνική αλληλουχία που εμφανίζει ομοιότητα με γνωστές υπεροξειδάσες ασκομυκήτων Τάξης ΙΙ. Η πρωτεΐνη αυτή φέρει σημαντική ομοιότητα με υπεροξειδάσες αίμης, κοινό χαρακτηριστικό των οποίων είναι μια α- έλικα. Η βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας δείχνει μια μικρή ομοιότητα με άλλες χαρακτηρισμένες υπεροξειδάσες βασιδιομυκήτων (30% ομοιότητα με υπεροξειδάσες του Pleurotus eryngii, 27% ομοιότητα με υπεροξειδάση της λιγνίνης του Phanerochaete chrysosporium και 31% ομοιότητα με υπεροξειδάση του μαγγανίου του Phlebia radiata). Το γονίδιο 2111272 επιλέχθηκε για ετερόλογη έκφραση στη ζύμη Pichia pastoris σκοπό τη μελέτη των ιδιοτήτων του. Το γονίδιο αποτελείται από δύο εξώνια, ένα εξώνιο 993 ζευγών βάσεων και ένα 96 ζευγών βάσεων στα οποία παρεμβάλλεται ένα εσώνιο 96 ζευγών βάσεων.

ATGAAGATCAGATATGTATTCCTCCTCTTCCTCGGCCTCGCTTCGCCTGGGGTCTCTCGGACTCTCCTGGGTATGAACAA
ATCTCTCGCCGGAGAAATCTCACCCGCCGCCGCGAAGCGTCAGACAGGGGAACTCCTAGCGGACCTCAGCACCCTCC
CTGACGCCGCTCTGTCACCGGCGGGCTGGACGATCAAGAACATTCTGCTCGGCAACCGCGCGGCCGTATCACCGCAG
GACCTGACCACCGTCTACACGGCCCCGGGACCGCTCGACAGCTCCGAATGCCGCCGCGAGACCTGCTGCGTGTGGA
AGTACATCGCAGACGCCATGGCTACGTCCTTCCGCGACGGCGCCGGCAGGTGTAACGAGCTCGCGCGCCAGGCGGT
CCGCCTGGGCTTCCATGACGCCGGCACGTGGTCGAAGTCCGCGGGCGGCGGCGGCGCCGATGGGTCCGTCCTCTTG
GCTCCCAGTGAGCTGGCGCGGGACGACAACCGCGCCCTCGAGGTCGTCGCGGCACAAATGGCGGCCTGGTACGCG
GAGTGGCGGCCCCGCGGCGCCCGCATGGCCGACCTGATCCAGATGGGCGCGGTGGTAGCAGCCGCGTCATGCCCGC
TGGGCCCCCGGGCACGCGCCTTCGTCGGGCGCAACGACAGTGCCACACCCGCCCCTCCGGACCGGCTCCCCTCGGC
CGCCAACAGCGACGCCGCCGCGCTGGCGGCGCTGTTTGCTGACAAGACGCTCAGCCTCGGCGAGCTTGTCGCCCTC
GTCGGTGCCCACACCACCAGCGTTCAGCGGTTCTTCGACCCGCTCGCCGCCGGGTCCCCGCAGGACTCTACGCCGGG
CGTCTGGGACACCCTCTACTACAACCAGACGGCCAGCTCGGATCCTCCGCAGGGCGTGTTTCGTTTCCCGAGCGACC
TGGCGCTGTCGCAATACCCCCCCGCGCGTGAGCTGTGGCAAACATTTGCGAATGCGCAGGCTGTGTGGAATGATGTG
AGCTTCATTTTGCCATGTGTATTTTTCATGCGTCTTCTTCCTTTTTCACTGGTGAGAGACAGGAAGAGACAAGGTGCTA
ATGCTGGCTTGCAG*GACTTTGCCGCTGCG*TACGTACACCTTAGCGTGCTCGGTGTTGAGCACATCAATGACCTGACAG
AGTGCACCGGTGTGCTGCCATTGTCGGGTTGA

Εικόνα 4.4: Το γονίδιο 2111272 όπως απομονώθηκε από το γονιδίωμα του M. Thermophila

4.6.1. Απομόνωση γονιδίου MtPerII από το γονιδίωμα του M. Thermophila

Το γονίδιο 2111272 απομονώθηκε από γονιδιακό DNA του M. thermophila με PCR με χρήση των κατάλληλων εκκινητών MtPerII-F και MtPerII-R:

Forward: 5'-GCATCGATGCGGACTCTCCTGGGTATGAAC-3'

Reverse: 5'-CGTCTAGACCCGACAATGGCAGCACACC-3'

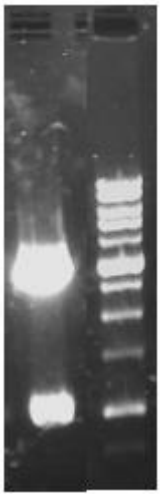
Οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο		
Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 2 min	
Αποδιάταξη DNA-στόχου (denaturation)	95 °C για 20 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing)	62 °C για 10 sec	
Επέκταση εκκινητών (extension)	68 °C για 30 sec	
Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	68 °C για 1 min	

Εικόνα 4.5: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR με μήτρα το απομονωμένο DNA του M. thermophila

4.6.2. Κλωνοποίηση σε pCR Blunt – Αφαίρεση εσωνίων

Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο φορέα pCR Blunt προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σωστή αλληλουχία του με πέψη με περιοριστικά ένζυμα.



Εικόνα 4.6: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,5% του προϊόντος της πέψης

Προκειμένου να απομακρυνθεί ένα εσώνιο 96 ζευγών βάσεων το οποίο περιλαμβάνεται στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου 2111272, πραγματοποιήθηκε η τεχνική της επικαλυπτόμενης PCR (overlapping PCR) με τη χρήση των παρακάτω εκκινητών:

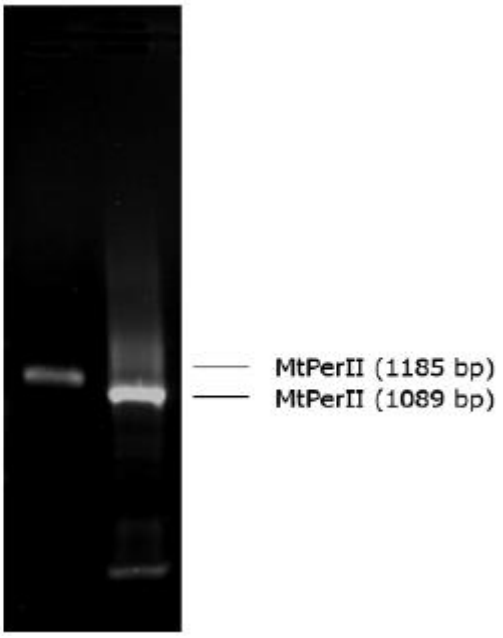
eiR 5'-CGCAGCGGCAAAGTCATCATTCCACACAGCCTGCGC-3'

e2F 5'-GACTTTGCCGCTGCGTACGT-3'

όπου σημειώνονται οι θέσεις των επικαλύψεων. Στο πρώτο στάδιο, τα δύο εξώνια (ένα 993 ζευγών βάσεων και ένα 96 ζευγών βάσεων) απομονώθηκαν σε ξεχωριστές αντιδράσεις, με τη χρήση των εκκινητών MtPerII-F και MtPerII-e1R για την απομόνωση του πρώτου εξωνίου και MtPerII-e2F και MtPerII-R για την απομόνωση του δεύτερου εξωνίου. Οι συνθήκες που ακολουθήθηκαν για τις αντιδράσεις είναι οι εξής:

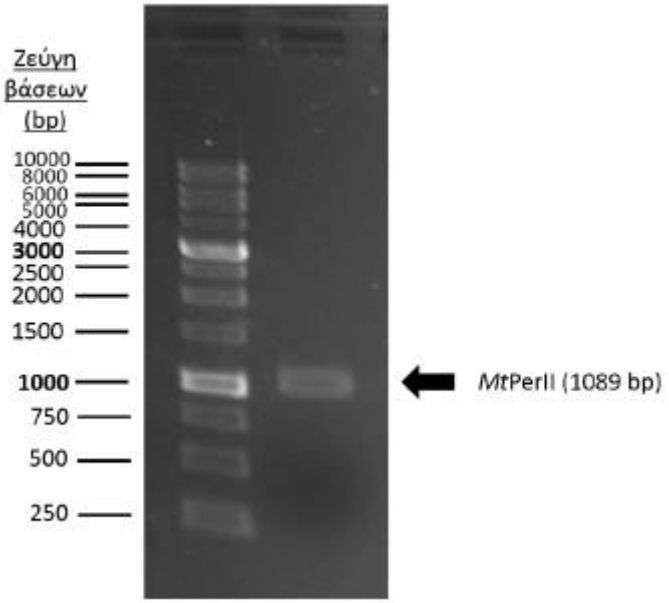
Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο		
Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 2 min	
Αποδιάταξη DNA-στόχου (denaturation)	95 °C για 20 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing)	60 °C για 10 sec	
Επέκταση εκκινητών (extension)	68 °C για 20 sec	
Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	68 °C για 1 min	

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, και οι κατάλληλες ζώνες που αντιστοιχούσαν στα εξώνια κόπηκαν και το DNA απομονώθηκε.



Εικόνα 4.7: Προϊόν της επικαλυπτόμενης PCR (δεξιά) και αρχικό γονίδιο (αριστερά)

Το προϊόν της PCR απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pCR Blunt προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ορθή του αλληλουχία, με πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα και αλληλούχιση.



Εικόνα 4.8: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος της επικαλυπτόμενης PCR, κόψιμο και απομόνωση της κατάλληλης ζώνης 1089 bp

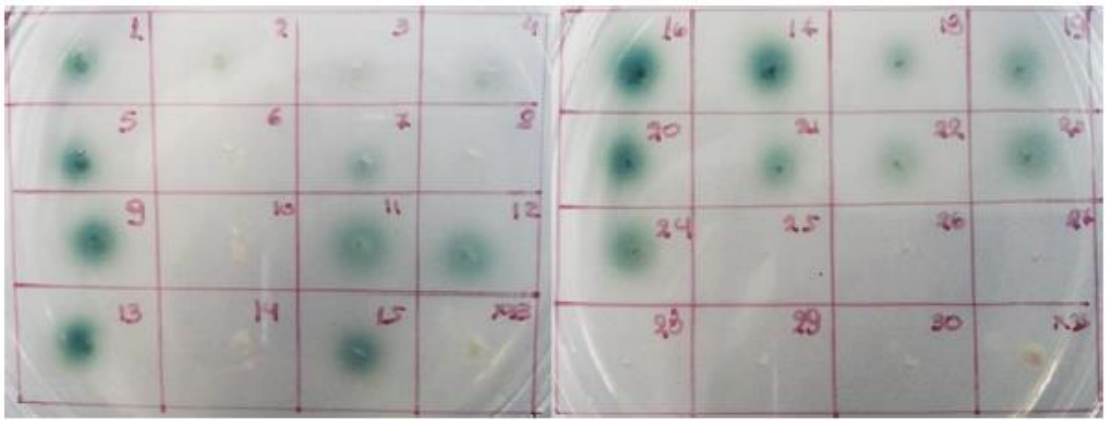
4.6.3. Κλωνοποίηση σε pPiCZa και γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου φορέα

Ακολούθως το πλέον «ώριμο» γονίδιο κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα ClaI, XbaI και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pPiCZaC. Ο ανασυνδυασμένος φορέας πολλαπλασιάστηκε σε κύτταρα E. coli, απομονώθηκε και η σωστή ενσωμάτωση του γονιδίου επιβεβαιώθηκε με πέψη με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και αλληλούχιση.

Στη συνέχεια ο ανασυνδυασμένος φορέας γραμμικοποιήθηκε με τη βοήθεια του ενζύμου PmeI, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων P. pastoris, με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης.

4.6.4. Ανάλυση μετασχηματισμένων κλώνων P. pastoris

Οι κλώνοι P. pastoris που ήταν ανθεκτικοί σε ζεοσίνη εξετάστηκαν ως προς την παραγωγή του ανασυνδυασμένου ενζύμου σε στερεές καλλιέργειες με προσθήκη ABTS. Μετά από ανάπτυξη 4 ημερών στους 30 ^{o}C, με καθημερινή προσθήκη 100 μL μεθανόλης, οι αποικίες που είχαν προκύψει καλύφθηκαν με μία σταγόνα διαλύματος H_2O_2 10 mM, και τα τρυβλία επωάστηκαν για 10 min, ούτως ώστε να αναπτυχθεί το πράσινο χρώμα.

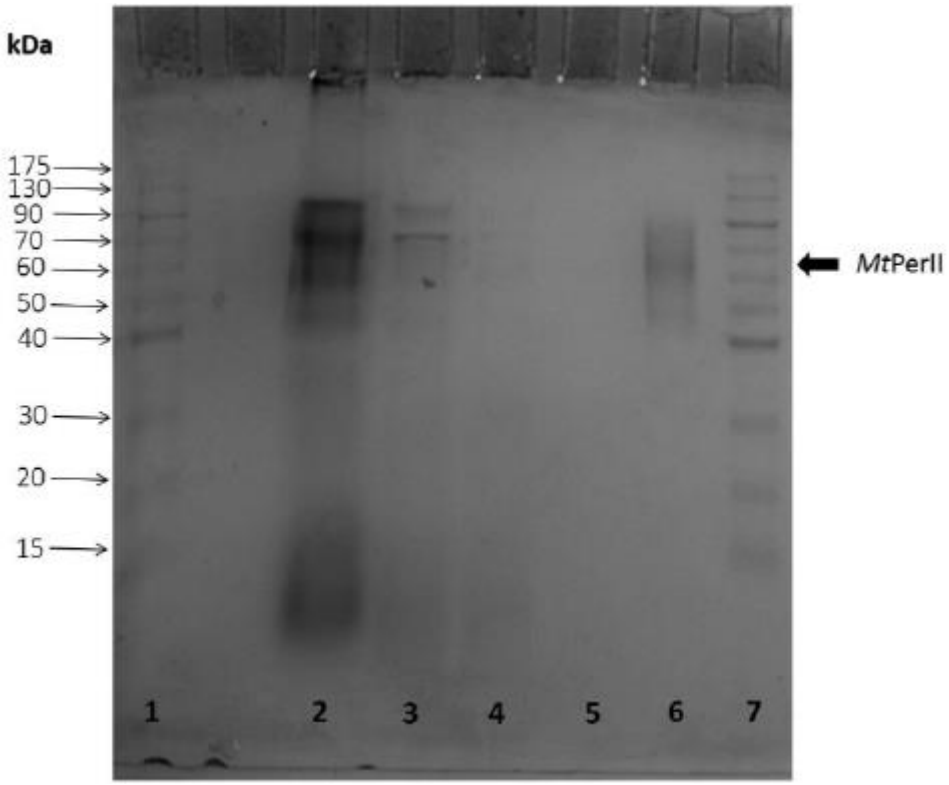


Εικόνα 4.9: Ανάπτυξη ανασυνδυασμένων κλώνων του P. Pastoris, για έλεγχο της ενεργότητας της MtPerII σε κάθε περίπτωση.

Η προσθήκη αίμης στο θρεπτικό μέσο βρέθηκε πως αυξάνει κατά πολύ την ενεργότητα της παραγόμενης MtPerII, αλλά ενισχύει επίσης και την κυτταρική ανάπτυξη. Η αίμη είναι μια ομάδα πορφυρίνης που περιέχει σίδηρο και βρίσκεται στο ενεργό κέντρο των υπεροξειδασών, αφού παίζει κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης, ενώ ότι η έλλειψη της από το θρεπτικό μέσο μπορεί να είναι ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στην παραγωγή του ετερόλογου ενζύμου.

4.6.5. Παραγωγή και απομόνωση της MtPerII

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό της ετερόλογης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες όγκου 1 L, ενώ έπειτα από τρεις ημέρες ανάπτυξης, όπου και παρατηρήθηκε η μέγιστη ενεργότητα υπεροξειδάσης, το υγρό της καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε, και το υπερκείμενο διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε. Κατόπιν, το υγρό εξισορροπήθηκε για 16 h σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (Talon) και η πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Η καθαρότητα του απομονωμένου ενζύμου ελέγθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Έτσι, στις σειρές 1 και 7 διακρίνουμε τους μάρτυρες των μοριακών βαρών, στηη δεύτερη σειρά βρίσκεται το συμπυκνωμένο υπερκείμενο της καλλιέργειας του μετασχηματισμένου κλώνου P. Pastoris, ενώ στις σειρές 3 και 4 το κλάσμα έκπλυσης της στήλης και το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε, αντίστοιχα. Τέλος, στην πέμπτη σειρά, υπάρχει η προσθήκη σε ιμιδαζόλιου 5 mM, ενώ στην έκτη βρίσκεται η καθαρή MtPerII.



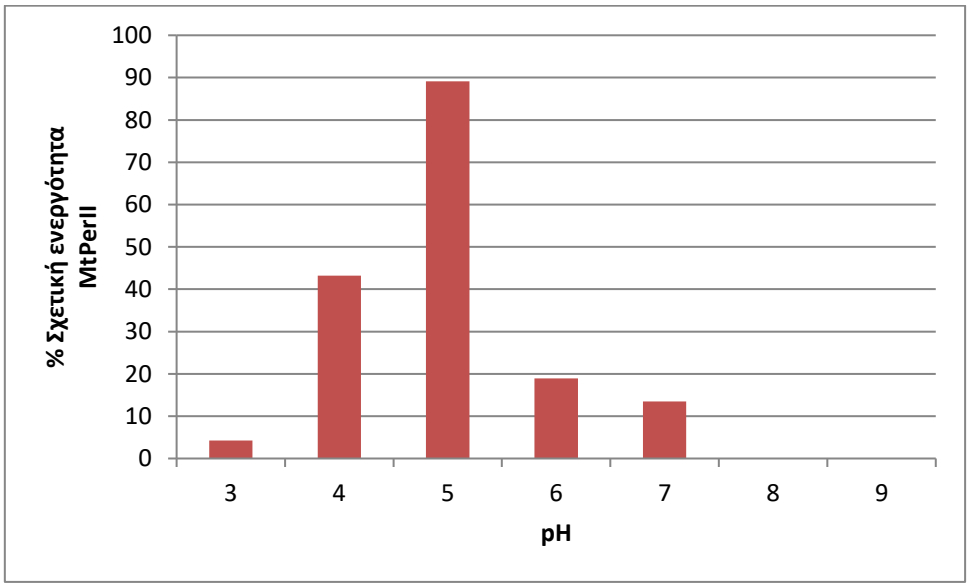
Εικόνα 4.10: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των ληφθέντων δειγμάτων από τον καθαρισμό την ετερόλογης πρωτεϊνης MtPerII

Η ετερόλογη πρωτεΐνη MtPerII μετά τον καθαρισμό εμφανίζεται σαν μια μεγάλη, θολή όμως ζώνη στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, η οποία αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος περίπου 65 kDa. Το μοριακό βάρος που βρέθηκε πειραματικά παρουσιάζει μεγάλη διαφορά από το θεωρητικά υπολογισμένο μοριακό βάρος των 38.5 kDa, συνυπολογίζοντας τα πρόσθετα 2.5 kDa του επίτοπου myc και της «ουράς» πολύ-

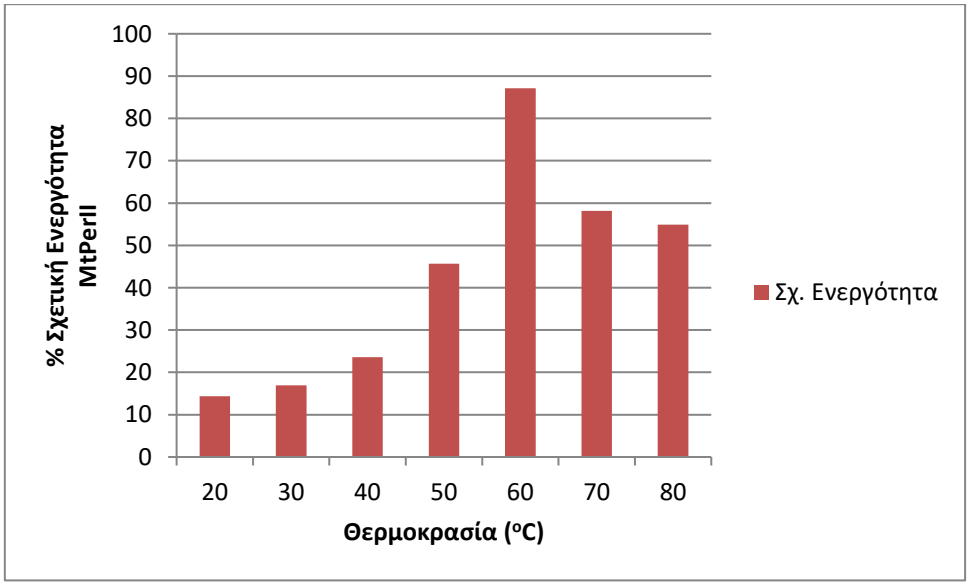
ιστιδίνης. Η διαφορά μεταξύ του θεωρητικού και του πειραματικού μοριακού βάρους της πρωτεΐνης μπορεί να οφείλεται σε υπεργλυκοζυλίωση, φαινόμενο πολύ κοινό στις περισσότερες χαρακτηρισμένες υπεροξειδάσες.

4.6.6. Χαρακτηρισμός της ετερόλογης MtPerII

Πραγματοποιήθηκαν διαδικασίες για την εύρεση του βέλτιστου pH και της ιδανικής θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου MtPerII, με τα αποτελέσματα να παρατίθενται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 4.23: % σχετική ενζυμική ενεργότητα επί της μέγιστης σε διάφορες τιμές pH



Διάγραμμα 4.24: % σχετική ενεργότητα επί της μέγιστης σε ποικίλες θερμοκρασιακές συνθήκες

Παρατηρούμε πως οι βέλτιστες συνθήκες δράσης της MtPerII είναι οι τιμές pH 5 και θερμοκρασία 60 ^{o}C.

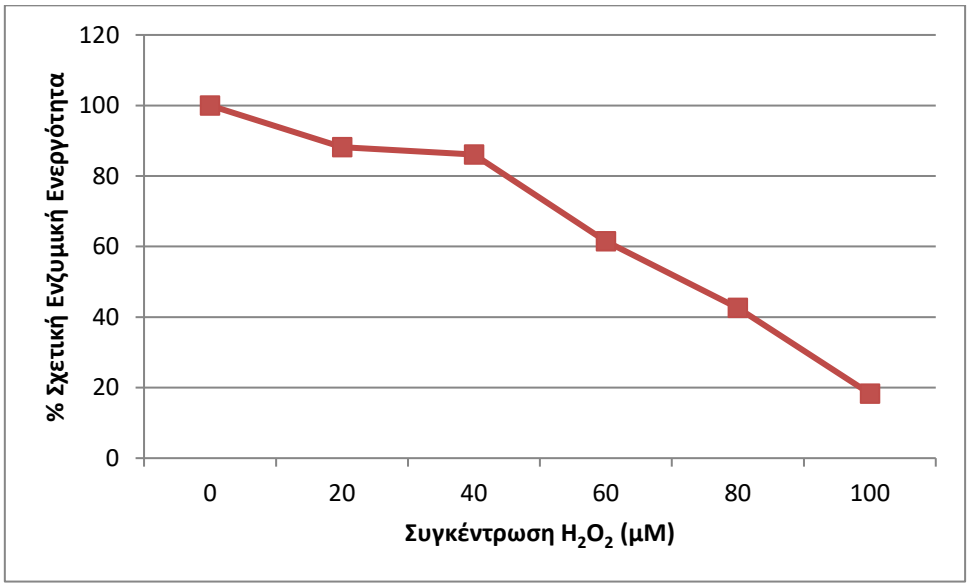
Θέλοντας να εξετάσουμε το βιοκαταλυτικό δυναμικό της εν λόγω υπεροξειδάσης, η δράση της δοκιμάστηκε σε διαφορετικά υποστρώματα, με τα αποτελέσματα της ειδικής ενεργότητας που εμφάνισε να είναι ενδεικτικά για ικανότητά της και να παραθέτονται ακολούθως.

Υποστρώματα (2 mM)	Ειδική Ενεργότητα (U/mg)
Υδροκινόνη	4,16
Κατεχόλη	0,57
2,6 διμεθοξυλαφαινόλη	0,55
Πυρογαλλόλη	2,45
Γουαϊακόλη	0,47
ABTS	179,04

Πίνακας 4.18: Ειδική ενεργότητα MtPerII σε διάφορα υποστρώματα

Διακρίνουμε πως σε υπόστρωμα ABTS επιτυγχάνεται η μέγιστη συγκριτικά ενεργότητα της MtPerII, ενώ σαφώς μικρότερα αποτελέσματα είχαν υποστρώματα όπως η υδροκινόνη και η πυρογαλλόλη.

Θέλοντας να εξετάσουμε το βιοκαταλυτικό δυναμικό της εν λόγω υπεροξειδάσης στη χρήση της σε εφαρμογές της βιομηχανίας, δοκιμάστηκε η σταθερότητα της σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2. Έτσι, πραγματοποιήθηκε επώαση του MtPerII με H_2O_2 σε διάφορες συγκεντρώσεις, με τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας να παραθέτονται ακολούθως.



Διάγραμμα 4.25: Σχετική Ενζυμική ενεργότητα της MtPerII σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα – Ερμηνεία Αποτελεσμάτων

5.1 Αποτοξικοποίηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου με χρήση επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων

Η αποτοξικοποίηση του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου συνέβη με χρήση επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων, τα οποία προμηθεύτηκαν από τη Μυκητοθήκη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα στελέχη επιλέχθηκαν με βάση την ικανότητα αποικοδόμησης του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου, ξεχωρίζοντας τα πιο αποδοτικά στελέχη εξ αυτών. Συγχρόνως, εξετάστηκε μια σειρά παραμέτρων που επιδρούν στην παραγωγή βιομάζας από τα εν λόγω στελέχη, αλλά και στην επαγωγή των απαραίτητων λιγνινολυτικών ενζύμων. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι:

- Η ρύθμιση απλών παραμέτρων κατά την ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων στο Υγρό Απόβλητο Ελαιουργείου, έχει τη δυνατότητα μείωσης του φαινολικού φορτίου αλλά και αποχρωματισμού του σε σημαντικά επίπεδα, άνω του 90%.
- Η πλέον σημαντική παράμετρος αναδείχθηκε η πηγή αζώτου, μιας και με εκείνη επιτεύχθηκαν και τα υψηλότερα επί τοις εκατό ποσοστά αποικοδόμησης και στα δύο στελέχη που εξετάστηκαν. Στις καλλιέργειες του I.Lacteus η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων αυξήθηκε σε ποσοστό περί τα 70% όσο και στον αποχρωματισμό του αποβλήτου, όπου για το ίδιο στέλεχος η αύξηση εμφάνισε ποσοστά άνω του 90%. Για το στέλεχος P. Citrinopileatus τα ποσοστά εμφάνισαν αρκετά χαμηλότερες τιμές. Σημαντικές διαφορές εμφανίστηκαν και στην παραγωγή των λιγνινολυτικών ενζύμων, μα και στην παραγωγή βιομάζας.
- Τα αποτελέσματα μπορούν να κριθούν ως λογικά και αναμενόμενα, αφού βιβλιογραφικά γνωρίζουμε τη μικρή περιεκτικότητα αζώτου των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου, οι οποία για κάποιους μικροοργανισμούς δεν είναι αρκετή για την κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών.
- Οι εξεταζόμενες πηγές αζώτου περιελάμβαναν άζωτο σε μορφή νιτρικών ιόντων, αμμωνιακών ιόντων, και αμινοξέων. Το νιτρικό άζωτο προστέθηκε με τη μορφή KNO_3, ενώ το αμμωνιακό άζωτο με το τρυγικό διαμμώνιο. Η παραπάνω ένωση επιλέχθηκε από βιβλιογραφικές πηγές, καθώς επιτρέπει την ευκολότερη ανάπτυξη και την παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων από βασιδιομύκητες. Το NH_4NO_3 περιέχει άζωτο σε μορφή νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων.

- Οι οργανικές μορφές αζώτου που επιλέχθηκαν ήταν το εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract), το οποίο είναι πλούσιο σε αμινοξέα και το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού (corn steep liquor – αναφέρεται και ως σιρόπι καλαμποκιού) ως μια σύνθετη, οικονομική πηγή αζώτου, πλούσια σε αμινοξέα αλλά και βιταμίνες.

Έτσι, βρέθηκε πως η προσθήκη πηγής αζώτου μπορεί να οδηγήσει στην επίτευξη σχεδόν ολοκληρωτικής αποτοξικοποίησης των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου.

Η μεταβολή της ενεργότητας των ενζύμων ανάλογα με τις εξεταζόμενες πηγές αζώτου έδωσε επίσης ορισμένα αξιοπρόσεκτα αποτελέσματα, όπως παρουσιάζονται παρακάτω:

- Οι ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης για τα στελέχη του γένους Pleurotus επιβεβαιώθηκε επιβεβαιώθηκε πως διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στην αποικοδόμηση της λιγνίνης, παρουσιάζοντας υψηλά επίπεδα ενεργότητας λακκάσης, άνω των 1000 U/L.
- Αντίστοιχες ενεργότητες λακκάσης δεν βρέθηκαν για το στέλεχος I. lacteus σε συνθήκες επαγωγής, αν το εν λόγω στέλεχος βρέθηκε ότι παράγει ένζυμα με ενεργότητα λακκάσης σε μικρό βαθμό.
- Τέλος, τα στελέχη που εξετάστηκαν ακολούθησαν δύο διαφορετικές ενζυμικές πορείες για την αποικοδόμηση της λιγνίνης. Ο P. citrinopileatus επέτυχε την αποικοδόμηση μέσω της παραγωγής υψηλών ποσοτήτων λακκάσης, ενώ I. lacteus μέσω της παραγωγής κυρίως υπεροξειδασώνμε τις δύο στρατηγικές να κρίνονται το ίδιο αποδοτικές στην περίπτωση της αποικοδόμησης των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου.

Βέβαια, παρά την σχεδόν πλήρη αποτοξικοποίηση του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου στις δύο περιπτώσεις, αυτό συνέβη σε αποστειρωμένο μέσο καλλιέργειας, ένα αρκετά απαιτητικό και χρονοβόρο χαρκατηριστικό της διεργασίας, με τα αποτελέσματα πιθανότατα να διαφέρουν σημαντικά σε διαφορετικές, μη αποστειρωμένες συνθήκες.. Συγχρόνως, η αραίωση του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου παρουσιάζει προβλήματα σχετικά με τη βιομηχανική του αξιοποίηση, καθώς, πέραν του αυξημένου οικονομικού κόστους που παρουσιάζει σε σχέση με τις μέχρι τώρα εφαρμόσιμες μεθόδους, απαιτεί τη συνεχή διαθεσιμότητα σε νερό, ενώ η εποχιακή παραγωγή του αποβλήτου και οι συστατικές διακυμάνσεις του ανά τα έτη δυσχεραίνουν την εφαρμογή της μεθόδου.

5.2 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός λιγνινολυτικών ενζύμων του μύκητα M. thermophila

Οι γονιδιακές αλληλουχίες που απομονώθηκαν από το γονιδίωμα του M. thermophila και κλωνοποιήθηκαν σε P. pastoris αφορούσαν την υπεροξειδάση Τάξης ΙΙ (MtPerII). Μετά την κλωνοποίηση και τον ομόλογο ανασυνδυασμό των γονιδίων στο γονιδίωμα της ζύμης P. pastoris, το ένζυμο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε, οδηγώντας στις εξής παρατηρήσεις:

- Το ένζυμο δεν εμφάνισε βιοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες ταυτόσημες με άλλα χαρακτηρισμένα ένζυμα της βιβλιογραφίας.
- Η οξείδωση των υποστρωμάτων συμβαίνει, εκτός από το ενεργό κέντρο όπου εντοπίζεται η αίμη, και στην επιφάνεια του ενζύμου σε σαφώς μικρότερο βαθμό.
- Ωστόσο, η MtPerII δεν μπορεί να οξειδώσει τη βερατρυλική αλκοόλη, όπως συμβαίνει με τις LiPs, ούτε το μαγγάνιο, όπως συμβαίνει με τις υπεροξειδάσες του Μαγγανίου.
- Η MtPerII μπορεί να οξειδώσει μια πληθώρα φαινολικών υποστρωμάτων, γεγονός που την ξεχωρίζει ως ένα ιδανικό βιοτεχνολογικό όπλο για πολλές συνθετικές εφαρμογές. Συγχρόνως, αναφερόμαστε σε ένα ιδιαίτερα θερμοσταθερό ένζυμο

Αναφερόμαστε, λοιπόν, σε έναν καινοτόμο βιοκαταλύτη που συμβάλει με τον τρόπο του στην διεύρυνση του υπάρχοντα γνωσολογικού ορίζοντα σχετικά με τα διάφορα ένζυμα και τις ιδιαίτερες ιδιότητες εκείνων.

5.3 Γενικά συμπεράσματα

Σε ό,τι αφορά τα γενικότερα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από τα πειραματικά αποτελέσματα της εν λόγω διπλωματικής εργασίας, καταλήξαμε στα εξής:

•Οι βασιδιομύκητες P. citrinopileatus και I. lacteus επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε υγρή καλλιέργεια με υπόστρωμα Υγρών Απόβλητων Ελαιουργείου σε συγκέντρωση 25% v/v.

•Η έντονη ανάδευση προσφέρει καλύτερο αερισμό στις καλλιέργειες, βοηθώντας την επιπέλον ανάπτυξη βιομάζας, ενώ με προσθήκη άλλων θρεπτικών συστατικών

(πηγές αζώτου), η ανάδευση προσφέρει βελτιστοποιημένη ομοιογένεια στις καλλιέργειες.

•Η ανάπτυξη των εξεταζόμενων μικροοργανισμών είναι άμεσα συνυφασμένη με την αποτοξικοποίηση των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου. Έτσι, παρατηρήθηκε πως στις καλλιέργειες μέγιστης βιομάζας και στις συνθήκες στις οποίες εκείνες πραγματοποιήθηκαν, υπήρξε ο μεγαλύτερος αποχρωματισμός του Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργείου, όπως επίσης και η μικρότερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις εντός αυτού.

•Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων ενδοκυτταρικά είναι τουλάχιστον 2 τάξεις μεγέθους μικρότερη από τη μείωση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου που παρατηρήθηκε, επιβεβαιώνοντας πως η αποτοξικοποίηση των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου οφείλεται στην αντίσοτιχη δράση των λιγνινολυτικών ενζύμων που μελετήθηκαν.

5.4 Μελλοντικοί στόχοι – Εφαρμογές

- Η μεταφορά και προσαρμογή της διεργασίας αποτοξικοποίησης Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου σε συνθήκες μεγάλης κλίμακας είναι ο επόμενος μεγάλος στόχος που πρέπει να υπάρξει μελλοντικά. Σχετικά με παραμέτρους όπως η αποστείρωση του υλικού, η αναγκαιότητα της ωθεί στην εύρεση του ιδανικού τρόπου εφαρμογής της, ειδικά σε ό,τι έχει να κάνει με παράγοντες οικονομικής φύσεως της διεργασίας.
- Επιπλέον, η αξιοποίηση του υγρού κλάσματος των καλλιεργειών, μετά το τέλος της διαδικασίας θα μπορούσε πιθανότατα να αξιοποιηθεί σε άλλες εφαρμογές βιοαποικοδόμησης, όπως για παράδειγμα η αποικοδόμηση βαφών, αλλά και σε ποικίλες άλλες εφαρμογές, ως ζωοτροφή, βελτιωτικό εδάφους ή βιολίπασμα.
- Η ετερόλογη υπεροξειδάση MtPerII θα μπορούσε να δοκιμαστεί σε πειράματα κατευθυνόμενης εξέλιξης για την επέκταση του εύρους των υποστρωμάτων που μπορεί να οξειδώσει. Συγχρόνως, πιθανές δομικές μελέτες του ενζύμου, προκειμένου να εξακριβωθεί ο μηχανισμός δράσης του, θα παρουσίαζαν χρησιμότητα στο να εξηγήσει τη σχέση μεταξύ των ενζύμων που προέρχονται από τους βασιδιομύκητες και εκείνα που προέρχονται από τους ασκομύκητες.
- Εφαρμογές κατασκευής ενζυμικών ηλεκτροδίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοαισθητήρες είναι το επόμενο βήμα μελλοντικών εφαρμογών της MtPerII, εξαιτίας της μεγάλης κλίμακας φαινολικών ενώσεων που δύναται να οξειδώσει.

Κεφάλαιο 6: Βιβλιογραφία

<u>Ξενόγλωσση βιβλιογραφία</u>:

- Abrunhosa L., Oliveira F., Dantas D., Gonçalves C., Belo I. (2013). Lipase production by Aspergillus ibericus using olive mill wastewater., Bioprocess and Biosystems Engineering
- Aggelis G.G., Gavala H.N., Lyberatos G. (2001). Combined and separate aerobic biotreatment of green olive debittering wastewater. Journal of Agricultural Engineering Research 80, 283-292.
- Andrich G., Balsini S., Zinnai A., Silvestri S. and Fiorentini R. (1992). Effect of olive oil waste water irrigation on olive plant products. Agricoltura Mediterranea 122, 97-100.
- Arora DS and Sharma RK. (2010). Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications
- Azbar N., Bayram A., Filibeli A., Muezzinoglu A., Sengul F. and Ozer A., (2004), A review of waste management options in olive oil production. Critical Reviews in Environmental Science and Technology,pp. 209-247
- Baldrian P., Zervakis GI., Merhautova V., Ntougias S., Ehaliotis C. and Nerud F.(2006). The use of hydroxyl-radical-generating systems for the treatment of olive mill wastewaters. Folia Microbiologicica 51, 337-341
- Balis C., Chjatjipavlidis J. and Flouri F. (1991). Integrated management of olive oil mills wastewaters. In Proceedings of the International Seminar 'Management of olive mills wastes', pp. 66-74.Geotechnical Chamber of Greece, Chania, Crete
- Barclay CD, Moore DM, Lander SR, and Legge RL. (1990). Heat- denaturation kinetics of lignin peroxidases from Phanerochaete chrysosporium. Enzyme Microb. Technol., 12, 778-782
- Berka R.M., Grigoriev I.V., Otillar R., Salamov A., Grimwood J., Reid I., Ishmael N., John T., Darmond C., Moisan M.C., Henrissat B., Coutinho P.M., Lombard V., Natvig D.O., Lindquist E., Schmutz J., Lucas S., Harris P., Powlowski J., Bellemare A., Taylor D., Butler G., de Vries R.P., Allijn I.E., van den Brink J., Ushinsky S., Storms R., Powell A.J., Paulsen I.T., Elbourne L.D., Baker S.E., Magnuson J., Laboissiere S., Clutterbuck A.J., Martinez D., Wogulis M., de Leon A.L., Rey M.W., Tsang A. (2011). Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi Myceliophthora thermophila and Thielavia terrestris. Nat Biotechnol. 29(10):922-7. doi: 10.1038/nbt.1976.
- Bertrand G. (1896). Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. C. R. Hebd. Seances Acad Sci 123: 463–465.

- Bhatt M., Cajthaml T., Sasek V. (2002). Mycoremediation of PAH-contaminated soil. Folia Microbiol. 47:255– 258.
- Blaich R., Esser K. (1975). Function of enzymes in wood destroying fungi. 2. Multiple forms of laccase in white rot fungi. Arch Microbiol 103: 271–277.
- Blanchette RA. (1995).Degradation of lignocellulose complex in wood. Can. J. Bot., 73, 999-1010
- Blanchette RA., Cease KR., and Abad AR. (1991). An evaluation of different forms of deterioration found in archaeological wood. Int. Biodeter.
- Blánquez P., Caminal G., Sarrà M., Vicent M. T., Gabarrell X. (2002). Olive Oil Mill Waste Waters Decoloration and Detoxification in a Bioreactor by the White Rot Fungus Phanerochaete flavido-alba, Biotechnology Progress, Volume 18, Isuue 3, Pages 660-662
- Borja R., Garrido S. E., Martinez L., Ramos-Cormenzana A. and Martin A. (1993).Kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater previously fermented with Aspergillus terreus. Process Biochemistry 28
- Bourbonnais R, and Paice MG. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin degradation. FEBS Lett., 267, 99-102
- Briving C, Gandvik EK, and Nyman PO. (1980). Structural studies around cysteine and cysteine residues in the “blue” oxidase fungal laccase B. Similarity in amino acid sequence with ceruloplasmin. Biochem. Biophys.Res. Commum. 93, 454-461
- Brock, T D and Madigan, M T. (1988). Biology of Microorganisms. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall
- Brozzoli V.,Crognale S.,Sampedro I.,Federici F.,D’Annibale A.,Petruccioli M.(2009), Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by Candida cylindracea in bench-top reactor, Bioresource Technology, Volume 100, Issue 13,pp 3395-3402
- Buswell JA. Fungal degradation of lignin. In D. K.Arora, B. Rai, K.G. Mukerji, and G.R. Knudson (eds). (1991). Handbook of applied Mycology, Vol 1, Marcel Dekker, New York,425-479
- Cabrera F., Lopez R., Martinez-Bordiú A., Dupuy de Lome E. and Murillo J.M. (1996).Land treatment of olive oil mill waste water. International Biodeterioration and Biodegradation 38, 215-225.
- Casa R., D’ Annibale A., Rieruccetti F., Stazi, S. R., Sermani G. G. and Lo Cascio B. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (Triticum durum desf.) germinability. Chemosphere 50, 959-966.
- Chang ST. (1999). World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on Lentinus edodes (Berk.) Sing. in China. Int. J. Med. Mushrooms, 1, 291-300

- Chen Y., Sarkanen S. and Wang Y.Y. (2012). Lignin-Degrading Enzyme Activities
- Cohen R, Persky L, and Hadar Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wooddegrading mushrooms of the genus Pleurotus. Appl. Microbiol. Biotechnol., 58, 582-594
- Cui F. and Dolphin D. (1990). The role of manganese in model systems related to a nylon-degrading enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1366- 1371
- Daniel G. and Nilsson T. (1998). Developments in the study of soft rot and bacterial decay.In, Bruce A., Palfreyman J.W. (eds). Forest Products Biotechnology. Taylor & Francis, Great Britain,37-62
- Denchev C. M., Venturella G. and Zervakis G. (2013). Identification and sustainable exploitation of wild edible mushrooms in rural areas. Mycoticon textbook
- Dey S, Maiti TK, and Bhattacharyya BC. (1994). Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, Polyporus ostreiformis, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. Appl. Environ. Microbiol. 60,4216-4218
- Dey S, Maiti TK, and Bhattacharyya BC. (1991). Lignin peroxidase production by a brown rot fungus Polyporus ostreiformis. J. Ferm. Bioeng., 72, 402-404
- Di Giovacchino L., Mascolo A. (1988). Incidenza delle techniche operative nell, estrazione dell, olio dale olive con il sistema continuo. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, 65, 283-289.
- Dias A. A., Bezerra R. M. and Pereira A. N. (2004). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. Bioresource Technology 92, 7-13.
- Dix NJ. and Webster J. (1995). Fungal Ecology. Chapman and Hall, Cambridge, Great Britain
- Eaton RA, and Hale MDC. (1993). Wood. Decay, pests and protection. Chapman & Hall,Cambridge,Great Britain
- Ehaliotis C., Zervakis G., Anoliefo O., Papadopoulou K. and Kardimaki A. (2003). The capacity of agricultural soils to auto-regulate bioremediation of olive-mill waste water.In The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions, pp. 353-358 (Eds. V. Sasek, J.A. Glaser and P. Baveye). Kluwer Academic Publishers,Dordrecht.
- Eriksson KEL, Blanchette RA, and Ander P. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Germany
- Escolano Bueno A. (1975). Tests on removal of waste liguid from olive oil extraction (alpechin), by disposal in ponds or lagoons for percolation and evaporation. Grasas y Aceites 26, 387-396.

- Falade A. O., Nwodo U. U., Iweriebor B. C., Green E., Mabinya L. V., Okoh A. I. (2016). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. Microbiologyopen. doi:10.1002/mbo3.394.
- Fawal N., Li Q., Savelli B., Brette M., Passaia G., Fabre M., Mathé C., Dunand D. (2013) PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. Nucleic Acids Res. Jan;41(Database issue):D441-4. PMID:23180785
- Fenice M., Giovannozzi Sermanni G., Federici F., D'Annibale A. (2003). Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by Panus tigrinus on olive mill wastewater-based media. Journal of Biotechnology 100(1): 77-85.
- Fiestas Ros de Ursinos, J. A., and Borja-Padilla, R., (1992). ˝Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain˝, Grasas y Aceites, 43(2), p.101–106
- Flores C., Casasanero R., Trejo-Hernández M.R., Galindo E., Serrano-Carreón L. (2010). Production of laccases by Pleurotus ostreatus in submerged fermentation in co-culture with Trichoderma viride, Journal of Applied Microbiology, Volume 108, Isuue 3, Pages 810-817
- Gern R.M.M., Wisbeck E., Rampinelli J.R., Ninow J.L, Furlan S.A.(2008). Alternative medium for production of Pleurotus ostreatus biomass and potential antitumor polysaccharides, Bioresource Technology, Volume 99, Issue 1, Pages 76-82
- Gernjak W., Krutzler T., Glaser A., Malato S., Caceres J., Bauer R. and Fernandez-Alba A. R. (2003). Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants.Chemosphere 50, 71-78.
- Glen JK. and Gold MH. (1985). Purification and characterisation of an extracellular Mn(II)-depedent peroxidase from the lignin -degrading basidiomycete, Phanerochaete chrysosporium. Arch. Biochem. Biophys. 242, 329-341
- Gold MH, Wariishi H, and Valli K. (1989). Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white- rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. In J.R. Whitaker and P.E. Sonnet (eds) Biocatalysis in Agricultural Biotechnology, Vol. ACS Symp. Ser. No 389, The American Chemical Society, Washington, 128-140
- Gold MH, Kuwahara A, Chiu A, and Glen JK. (1984). Purification and characterization of an extacellular of an extracellular H2O2-requiring diarylpropane oxygenase from the white rot basidiomycete, Phanerochaete chrysosporium. Arch. Biochem. Biophys. 1984, 234, 353-362
- Gonzàlez M. D., Moreno E., Quevedo-Sarmiento J. and Ramos-Cormenzana A. (1990).Studies on antibacterial activity of waste waters from olive oil mills (alpechin): Inhibitory activity of phenols and fatty acids. Chemosphere 20

- Greco G., Toscanoa G., Cioffi M., Gianfreda L. and Sannino F. (1999). Dephenolisation of olive mill waste-waters by olive husk, Water Research, Volume 33, Issue 13, pp.3046-3050
- Hatakka A. (2001).Biodegradation of lignin. In, Steinbüchel A. (ed). Biopolymers. Vol 1, Hofrichter M., Steinbüchel A. (eds). Lignin, Humic Substances and Coal. Wiley-VCH, Germany, 129-180
- Hestbjerg H, Willumsen PA, Christensen M, Andersen O, and Jacobsen CS. (2003). Bioaugmentation of tar-contaminated soils under field conditions using Pleurotus ostreatus refuse from commercial mushroom production. Environ. Toxicol. Chem., 22, 692-698
- Hofrichter M. (2002). Review, lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme Microb. Technol. 30, 454-466.
- Hofrichter M, Vares T, Kalsi M, Galkin S, Scheibner K, Fritsche W, and Hatakka A. (1999) Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of 14C-labelled lignin (14C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus Nematoloma frowardii. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1864-1870
- Jurasek I. (1995). Toward a three-dimensional model of lignin structure. J. Pulp and Paper Sci., 21, 274-279
- Justino B., Marques A.G., Duarte K.R., Duarte A.C., Pereira R., Rocha -Santos T., Freitas A.C. (2010). Degradation of phenols in olive oil mill wastewater by biological, enzymatic and photo-Fenton oxidation, Environmental Science and Pollution Research, Volume 17, Issue 3, Pages 650-656
- Kaal E., Field J., Joyce T. (1995). Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot Basidiomycetes by nitrogen-sufficient media, Bioresource Technology, Volume 53, Issue 2, Pages 133-139
- Kaim W. and Rall J. (1996). Copper-a modern bioelement. Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. 35, 43-60
- Kappelakis E.I., Tsagarakis P.K., Crowther C.J.(2008). Olive oil history,production and by-product management, Review Environmental Science Biotechnology,7, 1–26
- Karnaouri, A., Topakas, E., Antonopoulou, I., Christakopoulos, P. (2014). Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of Myceliophthora thermophila. Frontiers in Microbiology, 5, 281. http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00281
- Kavroulakis N., Ehaliotis C., Ntougias S., Zervakis G.I. and Papadopoulou K.K. (2005).Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by compost derived from agricultural residues. Physiological and Molecular Plant Pathology 66, 163-174.
- Kirk TK, and Farrell RL. (1987).Enzymatic “combustion”. The microbial degradation of lignin.Annu. Rev. Microbiol. 41, 465-505

- Kirk TK, Croan S, and Tien M. (1986). Production of multiple ligninases by Phanerochaete chrysosporium, Effect of selected growth conditions and use of a mutant. Enzyme Microbiol. Technol, 8, 27-32
- Kuhad R C, Singh A, and Eriksson KE. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In K.E. Eriksson (ed) Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, Springer- Verlag, germany, 46-125
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, and Gold MH.(1984). Separation and characterisation of 2 extracellular H2O2-depedent oxidases from ligninolytic cultures of Phanarechaete chrysosporium. Biochem. Biophys. Res. Comm, 178, 1092-1098
- Lau KL, Tsang YY, and Chiu SW. (2003). Use of spent mushroom compost to bioremediate PAHcontaminated samples. Chemosphere, 52, 1539-1546
- Leatham G.F. and Kirk T.K. (1983). Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes,FEMS Microbiology Letters, Volume 16, Issue 1, pages 65–67
- Lopez-Lopez MJ. (1993). Produccion de polisacaridos (xantano). por Xantamonas campestris utilizanto como sustrato alpechin. Tesina. Fac. Farmacia. Univ. de Granada.
- Maciel MJM., Silva AC., Ribeiro HCT. (2010). Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review, Brazil
- Madigan MT, Martinko JM, and Parker J. (2000). Brock. 1974 Biology of microorganisms. 9th edition, Pentice Hall, UK
- Makela M, Galkin S, Hatakka A, and Lundell T. (2002). Production of organic acids and oxalate decarboxylasein 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
- Martinez-Toledo M., Gonzalez-Lopez J., Rodelas B., Pozo C. and Salmeron V. (1995).Production of poly-b-hydroxybutyrate of Azotobacter chroococcum H23 in chemicallydefined medium and alpechin medium. Journal of Applied Bacteriology 78, 413-418
- Messerschmidt A. and Huber R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase, and ceruloplasmin, Modeling and structural relationships. Eur. J. Biochem. 187, 341-352
- Mester T. and Tien M. (2000).Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. Int. Biodeter. Biodegrad. 46, 51 – 59
- Miller G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Analytical Chemistry

- Morillo J.A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos- Cormenzana A., Russell N.J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes
- Niaounakis M. and Halvadakis C.P.(2006).Olive Processing Waste Management -Literature Review and Patent Survey, Second Edition, Elsevier,
- Niaounakis M. and Halvadakis C.P. (2004). Olive-mill waste management.Literature Review and Patent Survey. Typothito-George Dardanos.
- Ntougias S., Baldrian P., Ehaliotis C., Nerud F., Antoniou T., Merhautová V., Zervakis G.(2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera Ganoderma and Pleurotus, Chemosphere, Volume 88, Issue 5,Pages 620-626
- Ntougias S., Ehaliotis C., Papadopoulou K.K. and Zervakis G. (2006a). Application of respiration and FDA hydrolysis measurements for estimating microbial activity during composting processes. Biology and Fertility of Soils 42, 330-337.
- Ntougias S., Ehaliotis C., Zervakis G.I., Katsaris P. and Papadopoulou K. (2003).Monitoring the composting process of different agricultural wastes and evaluation of the effects of the final products on plants. In: Proceedings of the 8th International Conference on Environmental Science and Technology, pp. 666-673 (Ed. T.D. Lekkas), University of the Aegean and Global NEST, Lemnos, Greece.
- Odier E.and Delattre M. (1990). Multiple lignin peroxidases of Phanerochaete chrysosporium INA-12. Enzyme Microb. Technol., 12, 447-452
- Orth AB, Royse DJ, and Tien M. (1993). Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. Appl. Environ. Microbiol., 59, 4017-4023
- Ouzounidou G., Zervakis G.I. and Gaitis F. (2010). Raw and microbiologically detoxified olive mill waste and their impact on plant growth. Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology 4, 21-38.
- Papaspyridi L.M., Katapodis P., Gonou-Zagou Z., Kapsanaki-Gotsi E., Christakopoulos P. (2010). Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by Pleurotus ostreatus ATHUM 4438 under submerged culture, Biochemical Engineering Journal, Volume 50, Issue 3, Pages 131-138
- Paredes M.J., Ramos-Cormenzana A. and Martinez J. (1987). Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. Chemosphere 16, 1557-1564.
- Piotrowska A., Iamarino G., Antonietta R. M. and Gianfreda L. (2006). Short-term effects of olive mill waste water (OMW), on chemical and biochemical properties of semiarid Mediterranean soil. Soil Biology and Biochemistry 38, 600-610.

- Popp JL, Kalyanaraman B, and Kirk TK. (1990). Lignin peroxidase oxidation of Mn+2 in the presence of veratryl alcohol, malonic or oxalic acid, and oxygen. Biochemistry, 29,10475-10480
- Rajakumar S, Gaskell J, Gullen D, Lobos S, Karahanian E, and Vicuna R.(1996). LiP-like genes in Phanerochaete sorbida, and Ceriporiosis subevermispora, white rot fungi with no detectable lignin peroxidase activity. Appl. Environ. Microbiol., 62, 2660-2663
- Rayner ADM. and Boddy L. (1988). Fungal decomposition of wood. John Wiley & Sons,Great Britain
- Reid I. (1989). Solid-state fermentations for biological delignification, Enzyme and Microbial Technology, Volume 11, Issue 12, Pages 786-803
- Roig A., Cayuela M.L. and Sanchez-Monedero M.A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. Waste Management, Vol. 26, pp. 960- 969
- Sánchez C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi, Biotechnology Advances, Volume 27, Issue 2, pp. 185-194
- Shammas N. Kh. (1984). Olive oil extraction waste treatment in Lebanon. Effluent and Water Treatment Journal 24, 388-392.
- Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.(2001), Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances, vol. 19, pp 627–662
- Sierra J., Marti E., Montserrat G., Cruanas R., Garau, M.A. (2001). Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal, The Science of the Total Environment, 279, 207-214
- Spinelli R. and Picchi G. (2010). Industrial harvesting of olive tree pruning residue for energy biomass. Biosource Technology, Vol.101, pp.730-735
- Svendsen A. (2000). Lipase protein engineering, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, Volume 1543, Issue 2, pp. 223-238
- Thurston CF. (1994). The structure and function of fungal laccases. Microbiology, 140, 19-26
- Tien M. and Kirk TK. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete Phanerochaete chrysosporium. Burds. Science, 221, 661-663
- Tsagaraki E., Lazarides H. N. and Petrotos K. B. (2006). Olive Mill Wastewater Treatment. In: Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry, Springer US edition, p.133-157.
- Vermerris W., Nickolson R. (2006). Phenolic Compound Biochemistry
- Vlyssides A.G., Bouranis D.L., Loizidou M., and Karvouni G. (1996). Study of a demonstration plant for the co-composting of olive oil processing wastewater and solid residue. Bioresource Technology, 56, 187-193.

- Wariishi H, Valli K, and Gold MH. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. J. Biol. Chem., 267, 23688–23695
- Wariishi H, and Gold M H. (1990). Lignin peroxidase compound III. J. Biol. Chem. 65, 2070-2077
- Wariishi H, Valli K, Renganathan V, and Gold MH. (1989). Thiol-mediated oxidation of nonphenolic lignin model compounds by manganese peroxidase of Phanerochaete chrysosporium. J. Biol. Chem. 264, 14185–14191
- Waterhouse AL. (2001). Determination of Total Phenolics, in Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Wiley
- Zerva A., Zervakis G. I., Christakopoulos P. and Topakas E. Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. Journal of Environmental Management. Available online 3 March 2016
- Zervakis G. and Balis C. (1996b). Bioremediation of olive oil mill wastes through the production of fungal biomass. In: Proceedings of the Second International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, pp. 311-323 (ed. D. Royse). Pennsylvania, USA.
- Zervakis G., Yiatras P. and Balis C. (1996). Edible mushrooms from olive mill wastes.International Biodeterioration and Biodegradation 38, 237-243.
- Zouraris, D., Zerva, A., Topakas, E., Karantonis, A. Electrochemical study of the kinetics of MtPerII peroxidase, in preparation

Ελληνόφωνη Βιβλιογραφία

- Βλυσσίδης, Α. (1997). Μέθοδος διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων με το σύστημα της ηλεκτρόλυσης. Επιστήμη και Τεχνολογία 2,

- Δήμου Δ. (2005). Μύκητες-Μανιτάρια, Εισαγωγή στη βιολογία των μακρομυκήτων

- Ζέρβα Α. (2017). Βιοτεχνολογική αξιοποίηση μικροβιακου και ενζυμικού συστήματος λιγνινολυτικών μυκήτων, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

- Ζερβάκης, Γ. (1999). Διαχείριση και αξιοποίηση των αποβλήτων και παραπροϊόντων των ελαιοτριβείων. Ελαιοπαραγωγή, σελ. 98-103. Εύριπος Εκδοτική, Αθήνα.

- Ισραηλίδης, Ι.Κ. και Κωδούνη, Μ. Ι. (1982). Αξιοποίηση γεωργικών υπολειμμάτων και παραπροϊόντων για κτηνοτροφές και ενέργεια.. Γεωργική Έρευνα, 6, 243-253.

- Κάλφας Χ. (2007). Παραγωγή βιοαερίου από αναερόβια χώνευση προεπεξεργασμένου και μη ελαιοπολτού, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών

- Μαρίνος, Ε. (1991). Συμπύκνωση δια λιμνάσεως. Πρακτικά Διεθνούς Σεμιναρίου για τη Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων, σελ. 130-152. ΓΕΩΤΕΕ-Παράρτημα Κρήτης καιΔΣΕ, Χανιά.

- Μιχελάκης, V. και Κουτσαυτάκης, Α. (1989). Το πρόβλημα των αποβλήτων των ελαιουργείων. Δυσκολίες και προοπτικές για την αντιμετώπισή του. Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων. Πρακτικά Ημερίδας,, σελ. 9-25. Ηράκλειο.

- Μιχελάκης, V. (2000). Απόβλητα ελαιοτριβείων: Οικονομικότητα εφικτότητα των μεθόδων διαχείρισης αποβλήτων. Εκδόσεις Γεωργική Τεχνολογία Ελαιοκομία, σελ. 150-157.

- Μπαλατσούρας Γ. (1997), Σύγχρονη ελαιοκομία - Το ελαιόλαδο. Ιδιωτική έκδοση, Αθήνα

- Μπαλής, Κ., Χατζηπαυλίδης, Ι. και Φλουρή, Φ. (1991). Ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων. Πρακτικά Διεθνούς Σεμιναρίου για τη Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων, σελ. 66-74. ΓΕΩΤΕΕ-Παράρτημα Κρήτης και ΔΣΕ, Χανιά.

- Μπλίκα Π. (2009). Βιοτεχνολογικές μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών

- Νταλής Δ. (1989). Αναερόβια βιολογική επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιουργείων προς παραγωγή βιοαερίου. Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων. Πρακτικά Ημερίδας 31 Μάρτη-Ηράκλειο σελ. 42-52.

- Οιχαλιώτης, Κ. Δ. και Ζερβάκης, Γ. (1999-2000). Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων δύο και τριών φάσεων. Μια αξιολόγηση της υφιστάμενης κατάστασης. Ελιά και Ελαιόλαδο 14, 52-61.

- Ποντίκης Κ. (2000). Ελαιοκομία. Εκδόσεις: Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα.

- Ταούκης Π., Τζιά Κ., Ωραιοπούλου Β.(2009). «Επιστήμη και μηχανική τροφίμων» Ε.Μ.Π, Αθήνα

- Φακλάρης Π.Α. και Σταματοπούλου Β.Γ,(1999), Η ελιά και το λάδι στην αρχαία Ελλάδα.

- Χατζηπαυλίδης Ι. (1999). Επιπτώσεις των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων στη δυναμική και τις δράσεις των μικροβιακών πληθυσμών εμπλουτισμού στο έδαφος, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- Χρυσοβαλάντου V. (2010). Αξιολόγηση τριφασικής και διφασικής μεθόδου ελαιοποίησης του ελαιοκαρπού. Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο