



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας Ι

Μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Χριστίνα Ανδριανού

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΩΝ**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Κωνσταντίνα Κόλλια

Αθήνα, Φεβρουάριος 2023

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στη Μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου στα πλαίσια της ολοκλήρωσης των σπουδών μου κατά το Ακαδημαϊκό Έτος 2022 – 2023.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη της διπλωματικής μου εργασίας, καθηγήτρια του Ε.Μ.Π., κ. Κωνσταντίνα Κόλλια για την ανάθεση αυτού του ενδιαφέροντος θέματος. Η επιτυχής ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την συνεισφορά των Δρ. Έλλης Μπαραμπούτη και Δρ. Σοφίας Μάη. Θα ήθελα να τις ευχαριστήσω για τη συνεχή και πολύτιμη καθοδήγησή τους, τη βοήθεια που μου προσέφεραν σε οποιοδήποτε πρόβλημα παρουσιάστηκε, καθώς και για τον άψογο τρόπο επικοινωνίας τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Μιχάλη Σοφοκλέους και τον Κωνσταντίνο Πασσάδη που ήταν δίπλα μου με τη βοήθεια και την στήριξή τους για την ολοκλήρωση της μελέτης μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους εργάζονται στο εργαστήριο, οι οποίοι με βοήθησαν και με συμβούλευσαν σε οτιδήποτε χρειάστηκε.

Κλείνοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση που μου έδειξαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σήμερα, οι βιομηχανίες σε μια προσπάθεια να αυξήσουν τη βιωσιμότητά τους και να μειώσουν το αποτύπωμα άνθρακα, αναζητούν τρόπους αξιοποίησης των αποβλήτων τους αντί για απλή επεξεργασία. Ταυτόχρονα, καθώς αυξάνεται ο πληθυσμός του πλανήτη, αυξάνεται και η επισιτιστική ανασφάλεια με ανησυχητικούς ρυθμούς και έτσι αναζητούνται λύσεις. Για τον σκοπό αυτό, ο κύριος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση μιας καινοτόμου στρατηγικής αξιοποίησης των παραπροϊόντων μιας βιομηχανίας χυμού πορτοκαλιού σε υψηλής αξίας συστατικά ζωοτροφής.

Σε αυτό το πλαίσιο, σχεδιάστηκε μια στρατηγική αξιοποίησης όπου συμπεριλήφθηκαν ένα στάδιο σακχαροποίησης των φλοιών πορτοκαλιού και ένα στάδιο αερόβιας ζύμωσης του υγρού υπολείμματος της σακχαροποίησης. Και οι δύο διεργασίες βελτιστοποιήθηκαν μέσω παραγοντικού σχεδιασμού. Η διαδικασία σακχαροποίησης βελτιστοποιήθηκε όσον αφορά τα πηκτινολυτικά και κυτταρινολυτικά ένζυμα και το φορτίο των ολικών στερεών, ενώ η διεργασία αερόβιας ζύμωσης όσον αφορά την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, την αναλογία μαγιάς προς γλυκόζη και τον έλεγχο του pH. Από τα αποτελέσματα αυτών των διεργασιών προέκυψε ότι για την σακχαροποίηση οι βέλτιστες συνθήκες είναι 50°C, για 24h, με 7.5% φόρτιση στερεών και προσθήκη Pectinex 25μL/g TS και CellicCTec3 25 μL/g TS. Για την αερόβια ζύμωση οι βέλτιστες συνθήκες είναι 30°C, για 24h, χρησιμοποιώντας το προϊόν της υδρόλυσης των φλοιών πορτοκαλιού ως πηγή σακχάρων, προσθήκη θρεπτικών συστατικών και αναλογία μαγιάς προς γλυκόζη ίση με 0.02.

Σύμφωνα, λοιπόν, με τις βελτιστοποιημένες συνθήκες, η τελική ζωοτροφή θα πρέπει να διαμορφώνεται με την πραγματοποίηση των διαδοχικών διεργασιών της σακχαροποίησης και της αερόβιας ζύμωσης, υπό τις βέλτιστες συνθήκες, όπου τελικά θα προκύπτει ένα μίγμα ζωοτροφής που θα αποτελείται από το στερεό υπόλειμμα της σακχαροποίησης και την παραγόμενη μαγιά.

Τέλος, το υπόστρωμα αυτό θα πρέπει να ξηραίνεται προκειμένου να σταθεροποιηθεί το προϊόν όσον αφορά τη διάρκεια ζωής και την ασφάλειά του. Το τελικό προϊόν ζωοτροφής που παράχθηκε παρουσίασε περιεκτικότητα σε άζωτο $4.04 \pm 0.58\%$ και σε πρωτεΐνη $25.27 \pm 3.63\%$, σχεδόν τετραπλάσια από την διαθέσιμη πρωτεΐνη των φλοιών πορτοκαλιού, γεγονός που υποδεικνύει την αξία του ως συστατικό ζωοτροφής.

Ωστόσο, για την ολοκληρωμένη αξιοποίηση των φλοιών πορτοκαλιού εκτός από τη βελτιστοποίηση των βιολογικών διεργασιών απαιτείται και η εύρεση των κατάλληλων και βιώσιμων λύσεων που αφορούν στην διάθεση, μεταφορά και αποθήκευση του συγκεκριμένου αποβλήτου και στην συνέχεια της προηγμένης ζωοτροφής. Επίσης, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη στρατηγικής προώθησης και ενημέρωσης για το νέο προϊόν.

Λέξεις-κλειδιά: αερόβια ζύμωση, βιοοικονομία, βιοδιεργασία, κυκλική οικονομία, ένζυμα, ζωοτροφές βιώσιμη παραγωγή, φλοιοί πορτοκαλιού

ABSTRACT

Currently, in an effort to increase their sustainability and reduce their carbon footprint, industries are looking for ways to valorise their waste instead of simply treating it. At the same time, as the world's population grows, food insecurity is increasing at an alarming rate and solutions are being sought. To this end, the main objective of this work was to optimize an innovative valorisation strategy to convert by-products of the orange juice industry into high value secondary animal feed.

In this context, a utilization strategy was designed where a saccharification stage of orange peel and an aerobic fermentation stage of the liquid residue of saccharification were included. Both processes were optimised by means of a factorial design. The saccharification process was optimised in terms of pectinolytic and cellulolytic enzymes and total solids load, while the aerobic fermentation process was optimised in terms of nutrient addition, yeast to glucose ratio and pH control. The results of these processes showed that for saccharification the optimal conditions were 50°C, for 24 h, with 7.5% solids loading and addition of Pectinex 25µL/g TS and CellicCTec3 25 µL/g TS. For aerobic fermentation the optimum conditions were 30°C, for 24h, using orange peel hydrolysate as a source of sugars, addition of nutrients, yeast to glucose ratio equal to 0.02.

Therefore, according to the optimized conditions, the final animal feedstuff should be formulated by mixing the solid residue of orange peels after the saccharification process under the optimum conditions with the harvested yeast cultivated aerobically on orange peels hydrolysate. Finally, the formulated feedstock should be dried in order to stabilize the product in terms of shelf life and feed safety. The final feedstuff presented a nitrogen content of 4.04±0.58% and protein content of 25.27±3.63%, almost three times higher than the available protein of orange peel, revealing its high value as animal feed component.

However, for the full utilization of orange peels, besides optimizing the biological processes, it is necessary to find appropriate and sustainable solutions regarding the disposal, transport and storage of this waste and subsequently the advanced feed. It is also necessary to develop a marketing and information strategy for the new product.

Keywords: aerobic fermentation, bioeconomy, bioeconomy, bioprocess, circular economy, enzymes, feed sustainable production, orange peels

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΤΟ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ	13
1.1 Εισαγωγή.....	13
1.2 Ποικιλίες πορτοκαλιών	14
1.3 Παραγωγή πορτοκαλιών.....	14
1.4 Εμπόριο φρέσκων πορτοκαλιών.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΧΥΜΟΣ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΟΥ	18
2.1 Εισαγωγή.....	18
2.2 Βιομηχανίες παραγωγής χυμών πορτοκαλιού	19
2.2.1 Προϊόντα βιομηχανιών παραγωγής χυμών πορτοκαλιού.....	19
2.2.2 Διαδικασία παραγωγής χυμού πορτοκαλιού	19
2.2.3 Μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας χυμού πορτοκαλιού.....	21
2.3 Υπολείμματα βιομηχανιών χυμοποίησης πορτοκαλιών	22
2.3.1 Στερεά απόβλητα χυμοποιείων	23
2.3.2 Χαρακτηρισμός στερεών υπολειμμάτων πορτοκαλιού και φυσικοχημικές ιδιότητες	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΧΥΜΩΝ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΟΥ	24
3.1 Εισαγωγή.....	24
3.2 Εναλλακτικές αξιοποίησης αποβλήτων βιομηχανίας επεξεργασίας πορτοκαλιών	27
3.2.1 Διάθεση σε ΧΥΤΑ.....	27
3.2.2 Πηκτίνη.....	27
3.2.3 Αιθέρια έλαια.....	28
3.2.4 Λιπάσματα	28
3.2.5 Αιθανόλη	28
3.2.6 Μεθάνιο	28
3.2.7 Βιο-προσροφητικά.....	29
3.2.8 Υλικά συσκευασίας	29
3.2.9 Ζωοτροφή	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ	30
4.1 Εισαγωγή.....	30
4.2 Χρήση παραπροϊόντων φρούτων ως ζωοτροφή	31

4.3	Χρήση παραπροϊόντων εσπεριδοειδών ως ζωοτροφή	31
4.4	Ζωοτροφές και θρεπτικά συστατικά	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : Μονοκυτταρική πρωτεΐνη (Single cell protein – SCP)		36
5.1	Χρήση SCP	37
5.2	Βιομηχανική παραγωγή SCP	37
5.3	Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή SCP	38
5.3.1	Κριτήρια επιλογής μικροοργανισμών.....	38
5.3.2	Υποστρώματα για την παραγωγή SCP	39
5.3.3	Ύπαρξη αζώτου	39
5.3.4	Αερισμός	39
5.3.5	Θερμοκρασία και pH.....	39
5.3.6	Μικροοργανισμοί.....	40
5.4	Ζυμομύκητας <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
5.4.1	Παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP) από φλοιούς πορτοκαλιών και <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : Παραγοντικός Σχεδιασμός		41
6.1	Εισαγωγή.....	41
6.1.1	Βασικές έννοιες για τον σχεδιασμό πειραμάτων	41
6.1.2	Παράμετροι αριστοποίησης	42
6.1.3	Παράγοντες σχεδιασμού	43
6.1.4	Μαθηματικά μοντέλα	43
6.2	Σχεδιασμοί πρώτης τάξης	45
6.2.1	Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός.....	45
6.2.2	Μήτρες σχεδιασμού πειραμάτων.....	45
6.2.3	6.2.3 Ιδιότητες ενός παραγοντικού πειράματος	46
6.2.4	Βαθμοί ελευθερίας και αλληλεπιδράσεις	47
6.3	Εκτέλεση του πειράματος.....	47
6.3.1	Σφάλματα επαναλήψεων και διακύμανση της παραμέτρου αριστοποίησης	47
6.3.2	Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων	49
6.3.3	Αντιμετώπιση σφαλμάτων.....	50
6.4	Επεξεργασία αποτελεσμάτων	50
6.4.1	Προϋποθέσεις.....	50
6.4.2	Υπολογισμός συντελεστών συνάρτησης	50

6.4.3	Έλεγχος σημαντικότητας συντελεστών	53
6.4.4	Έλεγχος επάρκειας μαθηματικού μοντέλου.....	54
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		54
ΣΚΟΠΟΣ.....		54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....		55
7.1	ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ	55
7.2	ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	55
7.2.1.1	Προσδιορισμός ολικών στερεών TS.....	55
7.2.2	Προσδιορισμός πτητικών στερεών VS.....	56
7.2.3	Προσδιορισμός ελαίων.....	56
7.2.4	Προσδιορισμός υδατοδιαλυτών στερεών WS.....	57
7.2.5	Προσδιορισμός ολικού αζώτου με τη μέθοδο Kjeldahl.....	58
7.2.6	Προσδιορισμός κυτταρίνης	61
7.2.7	Προσδιορισμός ημικυτταρίνης.....	62
7.2.8	Προσδιορισμός λιγνίνης	63
7.2.9	Προσδιορισμός ελεύθερης γλυκόζης	64
7.2.10	Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων, TRS.....	65
7.2.11	Προσδιορισμός αιθανόλης	67
7.2.12	Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα TOC	68
7.2.13	Αναλυτική τακτική Van Soest.....	69
7.2.14	Χώνευση στερεών δειγμάτων με μικροκύματα	72
7.2.15	Προσδιορισμός μετάλλων	76
7.2.16	Προσδιορισμός ορθο-φωσφορικών	79
7.3	Βιοδιεργασίες	79
7.3.1	Ενζυμική υδρόλυση	79
7.3.2	Αερόβια ζύμωση	80
7.4	Πειραματικές διατάξεις	82
7.4.1	Πειραματική διάταξη μεσαίας κλίμακας.....	82
7.4.2	Πιλοτική μονάδα βιομετατροπής	83
7.4.3	Πιλοτική μονάδα ξήρανσης	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ		86
8.1	Παραγοντικός σχεδιασμός πειραματικών δοκιμών	86
8.1.1	1 ^{ος} παραγοντικός σχεδιασμός: Βελτιστοποίηση σακχαροποίησης.....	86

8.1.2	2 ^{ος} παραγοντικός σχεδιασμός: Βελτιστοποίηση αερόβιας ζύμωσης	88
8.2	Ανακλιμάκωση διεργασιών σακχαροποίησης και αερόβιας ζύμωσης	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		89
9.1	Σύσταση πρώτων υλών	89
9.2	1 ^{ος} πειραματικός κύκλος (παραγοντικός σχεδιασμός σακχαροποίησης)	92
9.3	2 ^{ος} πειραματικός κύκλος (παραγοντικός σχεδιασμός για την καλλιέργεια μονοκυτταρικής πρωτεΐνης)	94
9.4	Ανακλιμάκωση διεργασιών σακχαροποίησης και αερόβιας ζύμωσης	94
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 : ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ		96
10.1	Αποτελέσματα 1 ^{ου} παραγοντικού σχεδιασμού	96
10.1.1	Υπολογισμός μέσων τιμών και στατιστικού σφάλματος	98
10.1.2	Υπολογισμός των συντελεστών των παραγόντων	100
10.1.3	Έλεγχος σημαντικότητας των συντελεστών	102
10.1.4	Έλεγχος επάρκειας γραμμικού μοντέλου	104
10.2	Αποτελέσματα 2 ^{ου} παραγοντικού σχεδιασμού	106
10.2.1	Υπολογισμός μέσων τιμών και στατιστικού σφάλματος	106
10.2.2	Υπολογισμός των συντελεστών των παραγόντων	108
10.2.3	Έλεγχος σημαντικότητας των συντελεστών	109
10.2.4	Έλεγχος επάρκειας γραμμικού μοντέλου	110
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11 : ΣΥΝΘΕΣΗ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ		111
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		112
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ		114
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		115
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ		119

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Στατιστικά στοιχεία παγκόσμιας παραγωγής πορτοκαλιών (χιλιάδες τόνοι) ⁶	16
Πίνακας 2: Στατιστικά στοιχεία παγκόσμιας εισαγωγής πορτοκαλιών (χιλιάδες τόνοι) ⁶	17
Πίνακας 3: Στατιστικά στοιχεία παγκόσμιας εξαγωγής πορτοκαλιών (χιλιάδες τόνοι) ⁶	17
Πίνακας 4: Στατιστικά στοιχεία για την χρήση πορτοκαλιών για παραγωγή επεξεργασμένων προϊόντων (χιλιάδες τόνοι) ⁶	17
Πίνακας 5: Στατιστικά στοιχεία παραγωγής και εξαγωγών στην Ελλάδα (χιλιάδες τόνοι) ⁶	18
Πίνακας 6: Σύσταση φλοιού πορτοκαλιού (% ξ.β.) ^{23 25 26}	24
Πίνακας 7: Σύσταση φλοιού πορτοκαλιού (% ξ.β.) ^{27 28}	24
Πίνακας 8: Μήτρα σχεδιασμού πειραμάτων για ένα 2 ² παραγοντικό πείραμα	45
Πίνακας 9: Μήτρα σχεδιασμού πειραμάτων για ένα 2 ³ πείραμα	46
Πίνακας 10: Ποσότητες θρεπτικών ενώσεων για την καλλιέργεια μαγιάς	81
Πίνακας 11: Επίπεδα 1 ^{ου} παραγοντικού σχεδιασμού	87
Πίνακας 12: Πειραματικές δοκιμές σακχαροποίησης χρησιμοποιώντας φλοιούς πορτοκαλιών	87
Πίνακας 13: Επίπεδα 2 ^{ου} παραγοντικού σχεδιασμού	88
Πίνακας 14: Πειραματικές δοκιμές αερόβιας ζύμωσης	88
Πίνακας 15: Χαρακτηρισμός τροφοδοσίας με την κλασική μέθοδο και την μέθοδο Van Soest	90
Πίνακας 16: Χαρακτηρισμός εργοστασιακής μαγιάς	91
Πίνακας 17: Συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων πρώτων υλών	91
Πίνακας 18: Συγκεντρώσεις μακρο-μετάλλων πρώτων υλών	92
Πίνακας 19: Σύσταση υγρής φάσης πειραμάτων 1 ^{ου} πειραματικού κύκλου	92
Πίνακας 20: Σύσταση ξηρού στερεού πειραμάτων 1 ^{ου} πειραματικού κύκλου	93
Πίνακας 21: Αποτελέσματα αερόβιας ζύμωσης 2 ^{ου} πειραματικού κύκλου	94
Πίνακας 22: Μετρήσεις συγκεντρώσεων γλυκόζης και αιθανόλης ενζυμικής υδρόλυσης στην πιλοτική μονάδα	96
Πίνακας 23: Αποδοτικότητα αποικοδόμησης και απόδοση σακχαροποίησης πειραμάτων 1 ^{ου} πειραματικού κύκλου	97
Πίνακας 24: Επεξεργασία αποτελεσμάτων για την εύρεση του σφάλματος για απόδοση	99
Πίνακας 25: Δεδομένα υπολογισμού συντελεστών b	101
Πίνακας 26: Συντελεστές b της εξίσωσης της παραμέτρου αριστοποίησης	102
Πίνακας 27: Η σημαντικότητα των συντελεστών των παραγόντων	103
Πίνακας 28: Υπολογισμός της διασποράς της επάρκειας	105
Πίνακας 29: Αποτελέσματα ελέγχου επάρκειας γραμμικού μοντέλου	105
Πίνακας 30: Δευτερογενή αποτελέσματα αερόβιας ζύμωσης	106
Πίνακας 31: Επεξεργασία αποτελεσμάτων για την εύρεση του σφάλματος για απόδοση	107
Πίνακας 32: Δεδομένα υπολογισμού συντελεστών b	108
Πίνακας 33: Συντελεστές b της εξίσωσης της παραμέτρου αριστοποίησης	108
Πίνακας 34: Η σημαντικότητα των συντελεστών των παραγόντων	109
Πίνακας 35: Υπολογισμός της διασποράς της επάρκειας	110
Πίνακας 36: Αποτελέσματα ελέγχου επάρκειας γραμμικού μοντέλου	110
Πίνακας 37: Σύσταση ξηρών επεξεργασμένων φλοιών πορτοκαλιού υπό τις βέλτιστες συνθήκες της εφαρμοζόμενης στρατηγικής	112
Πίνακας 38: Τιμές Cochran G (95% στατιστικής σημαντικότητας)	119

Πίνακας 39: Τιμές πίνακα t Student.	119
Πίνακας 40: Τιμές λόγου Fisher (95% στατιστικής σημαντικότητας).....	119

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ανατομία καρπού πορτοκαλιού.	14
Εικόνα 2: Πυραμίδα ιεράρχησης διαχείρισης αποβλήτων. ³⁰	25
Εικόνα 3: Διάγραμμα μαύρου κουτιού κυβερνητικής.....	42
Εικόνα 4: Γραφική παράσταση ενός 2 ³ πειράματος.....	46
Εικόνα 5: Διάγραμμα των συνιστωσών του σφάλματος μέτρησης.	48
Εικόνα 6: Πειραματικό διάγραμμα ροής.	55
Εικόνα 7: Διαδικασία χώνευσης.	59
Εικόνα 8: Συσκευή αυτόματης απόσταξης Varodest.....	60
Εικόνα 9: Τιτλοδότηση.....	61
Εικόνα 10: Συσκευή μέτρησης TOC.	69
Εικόνα 11: Στάδιο εκπλύσεων σακιδίων.	71
Εικόνα 12: Φούρνος μικροκυμάτων MilestoneStartD.....	72
Εικόνα 13: Πειραματική διάταξη αερόβιας ζύμωσης.	81
Εικόνα 14: Πειραματική διάταξη μεσαίας κλίμακας.	82
Εικόνα 15: Οι δύο βιοαντιδραστήρες της πιλοτικής μονάδας.	83
Εικόνα 16: Βασικά μέρη συστήματος θέρμανσης.	84
Εικόνα 17: Ρυθμιστής pH.	84
Εικόνα 18: Πίνακας ελέγχου πιλοτικής μονάδας.	85
Εικόνα 19: Ξηραντήρας GAIA GC - 100.	86
Εικόνα 20: Διάγραμμα ροής και ισοζύγια μάζας της στρατηγικής που εφαρμόστηκε για την επεξεργασία των φλοιών πορτοκαλιού.	111

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια καθώς αυξάνεται ο παγκόσμιος πληθυσμός, αυξάνεται και η κατανάλωση τροφίμων από τον άνθρωπο. Στα επόμενα 30 χρόνια, ο παγκόσμιος πληθυσμός θα αυξηθεί κατά 2 δισεκατομμύρια άτομα καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για λήψη των κατάλληλων προκειμένου να ανταποκριθούμε στις απαιτήσεις της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων. Το πρόβλημα αυτό δεν περιορίζεται στην διατροφή των ανθρώπων, αλλά επεκτείνεται και σε εκείνη των ζώων, με τους κτηνοτρόφους να αναζητούν εναλλακτικά συστατικά ζωοτροφών προκειμένου να καλυφθούν οι ανάγκες για σίτιση των βοοειδών, των πουλερικών και των ψαριών. Με βάση τις προβλέψεις του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών από το 2010 έως το 2050, η ζήτηση για τρόφιμα θα αυξηθεί κατά 60%. Επιπλέον, προβλέπεται ότι η ζήτηση για ζωικές πρωτεΐνες θα αυξηθεί κατά 1.7% ετησίως, ενώ η παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων και κρέατος αναμένεται να αυξηθεί κατά 55% και 70%, αντίστοιχα. Η ζήτηση για ζωοτροφές μηρυκαστικών οφείλεται κυρίως στην αύξηση της κατά κεφαλήν κατανάλωσης κρέατος σε όλο τον κόσμο και στην υιοθέτηση πρακτικών εντατικής εκτροφής.

Ταυτόχρονα, σημαντικός περιορισμός στην ανάπτυξη εναλλακτικών τροφών αποτελεί το συνεχώς αυξανόμενο κόστος των πρώτων υλών. Επίσης, οι νέες διατροφικές συνήθειες των πολιτών που κατευθύνονται κυρίως στην κατανάλωση προϊόντων ζωικής προέλευσης από ζώα βιολογικής εκτροφής αποδυναμώνουν τον τομέα των σύνθετων ζωοτροφών. Ως εκ τούτου, απαιτείται να γίνει σωστός χειρισμός που θα έχει ως στόχο την διατήρηση της διατροφικής αξίας των ζωοτροφών, την βιωσιμότητα της κτηνοτροφικής βιομηχανίας και την κερδοφορία. Αυτό μπορεί να γίνει εφικτό αξιοποιώντας αγροτοβιομηχανικά απόβλητα ως συστατικά ζωοτροφής.

Η καλλιέργεια των πορτοκαλιών και η επεξεργασία τους για παραγωγή άλλων προϊόντων, όπως ο χυμός, έχουν ισχυρή παρουσία στον τομέα των τροφίμων και αποτελούν σημαντική βιομηχανία. Μάλιστα, η μεγάλη ζήτηση των προϊόντων αυτών σε καθημερινή βάση από τους καταναλωτές έχει ως αποτέλεσμα και την δημιουργία μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων μιας και κατά την παραγωγή του χυμού μόνο το μισό μέρος του πορτοκαλιού αξιοποιείται, ενώ το υπόλοιπο απομακρύνεται ως υπόλειμμα. Το τελευταίο αποτελείται από τις φλούδες, τους σπόρους, τον πολτό και τα φύλλα και πιθανώς, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως οργανική πρώτη ύλη για την παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

Λαμβάνοντας όλα τα παραπάνω υπόψιν, η συγκεκριμένη εργασία ασχολείται με την διαχείριση των αποβλήτων βιομηχανιών επεξεργασίας πορτοκαλιών για την παραγωγή συστατικών ζωοτροφής. Πιο συγκεκριμένα, στόχος της εργασίας είναι η χρήση φλοιών πορτοκαλιών, που προέρχονται από βιομηχανίες παραγωγής χυμών, για την παραγωγή ενός βελτιωμένου συστατικού ζωοτροφής για πρόβατα γαλακτοπαραγωγής. Προκειμένου να ληφθεί ένα θρεπτικό συστατικό, θα πρέπει να μειωθεί η περιεκτικότητα σε πηκτίνη και ελεύθερα σάκχαρα και να αυξηθεί η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Η διαδικασία επεξεργασίας που πραγματοποιήθηκε είναι η ενζυμική υδρόλυση και η αερόβια ζύμωση. Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης, υιοθετήθηκε ως μεθοδολογική προσέγγιση ο παραγοντικός πειραματικός σχεδιασμός.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΤΟ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ

1.1 Εισαγωγή

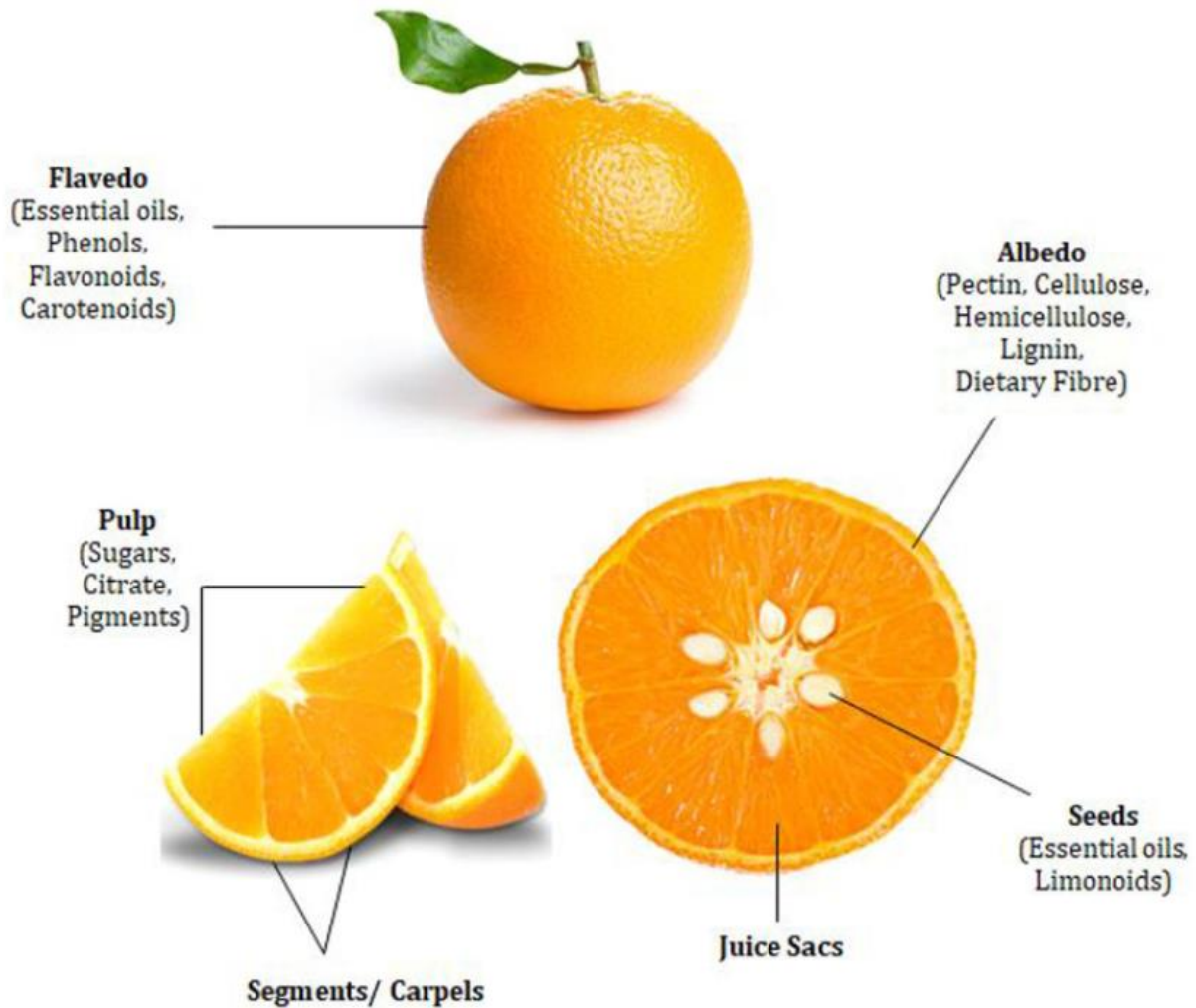
Τα εσπεριδοειδή αποτελούν μια από τις σημαντικότερες καλλιέργειες φρούτων παγκοσμίως και καλλιεργούνται σε 140 χώρες. Τα εσπεριδοειδή προέρχονται από περιοχές της Ασίας και της Ωκεανίας. Οι χώρες που κατέχουν τις υψηλότερες θέσεις στην παραγωγή εσπεριδοειδών είναι η Κίνα, η Βραζιλία και οι ΗΠΑ. Οι καλλιέργειες των εσπεριδοειδών μπορεί να γίνονται σε μικρές, μεσαίες αλλά και πολύ μεγάλες εκτάσεις. Κάθε δέντρο μπορεί να έχει διάρκεια ζωής 50 χρόνια και περισσότερο.

Τα εσπεριδοειδή και τα προϊόντα τους αποτελούν πλούσια πηγή βιταμινών, μετάλλων και φυτικών ινών που είναι απαραίτητα συστατικά της διατροφής του ανθρώπου. Μάλιστα αποτελούν την κύρια πηγή βιταμίνης C για τον άνθρωπο.

Τα πορτοκάλια, τα λεμόνια, τα μανταρίνια και τα γκρέιπφρουτ είναι από τα πιο συχνά καλλιεργούμενα είδη εσπεριδοειδών και διατίθενται και καταναλώνονται ως φρέσκα φρούτα, χυμοί ή συμπυκνώματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα παραπροϊόντα τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφές. Τα πορτοκάλια αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό της παγκόσμιας παραγωγής και είναι τα πιο δημοφιλή από τα εσπεριδοειδή, ενώ ακολουθούν τα μανταρίνια, τα λεμόνια και τα γκρέιπφρουτ.¹

Η καλλιέργεια του πορτοκαλιού, ή με την επιστημονική του ονομασία *Citrus sinensis*, αντιπροσωπεύει περίπου το 70% της συνολικής ετήσιας καλλιέργειας των εσπεριδοειδών. Το πορτοκάλι προέρχεται από την Ασία, ωστόσο πλέον καλλιεργείται σε όλες τις θερμές περιοχές του πλανήτη.

Το δέντρο της πορτοκαλιάς είναι αειθαλές ανθοφόρο και φτάνει σε ύψος 9 – 10 μέτρα. Τα φύλλα του έχουν επιμήκες ωοειδές σχήμα και αναδύουν την έντονη χαρακτηριστική οσμή των εσπεριδοειδών. Οι καρποί έχουν σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα και ωριμάζουν αποκτώντας πορτοκαλί χρώμα. Ως προς την ανατομία τους, αποτελούνται από δύο περιοχές το περικάρπιο, δηλαδή την φλούδα ή φλοιό και το ενδοκάρπιο, δηλαδή τον πολτό ή πούλπα με τους αδένες που φέρουν τον χυμό του καρπού. Ο φλοιός αποτελείται από αρωματικούς ελαιοφόρους αδένες που προσδίδουν την ιδιαίτερη οσμή του. Το περικάρπιο αποτελείται από το εξωτερικό flavedo ή επικάρπιο, το οποίο αποτελείται σε μεγάλο βαθμό από παρεγχυματικά κύτταρα και επιδερμίδα. Το albedo ή μεσοκάρπιο που βρίσκεται κάτω από το flavedo.



Εικόνα 1: Ανατομία καρπού πορτοκαλιού.

Ο καρπός περιέχει συνήθως μια γλυκιά σάρκα και αρκετούς σπόρους στο εσωτερικό του. Ο πολτός του έχει γεύση που βαίνει από ξινή σε γλυκιά. Στους οπωρώνες ο καρπός είναι ευαίσθητος στον παγετό, ωστόσο είναι πολυετής και έχει προσαρμοστεί σε διάφορα κλίματα.²

1.2 Ποικιλίες πορτοκαλιών

Οι ποικιλίες των πορτοκαλιών ταξινομούνται σε τέσσερις ομάδες^{3 4}:

1. Την ομάδα των ομφαλόμορφων ποικιλιών (πχ. Washington, Palmer, Navelate)
2. Την ομάδα των αιματόχρωμων ποικιλιών (πχ. Moro, Tarocco, Σαγκουίνι)
3. Την ομάδα των γλυκόχυμων ποικιλιών και
4. Την ομάδα των κοινών ποικιλιών (πχ. Valencia, Hamlin, Shamouti)

1.3 Παραγωγή πορτοκαλιών

Η παγκόσμια παραγωγή πορτοκαλιών αναμένεται να φτάσει τα 77 εκατομμύρια τόνους το 2023.⁵

Βραζιλία

Παρά τις δυσκολίες που έχουν εμφανιστεί τα τελευταία χρόνια, η Βραζιλία εξακολουθεί να είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός πορτοκαλιών καλύπτοντας το 30 % της αγοράς. Η παραγωγή μεταξύ των περιόδων 2001-2003 και 2011-2013 αυξήθηκε κατά 1.3 % ετησίως, όπου έφτασε τα 18.4 εκατομμύρια τόνους. Ωστόσο, λόγω της αύξησης των μισθών των εργατών, των φυτοφαρμάκων και της μείωσης των τιμών των προϊόντων, ειδικότερα οι μικροί καλλιεργητές δεν μπορούσαν να ανταπεξέλθουν στα έξοδα, επομένως παρατηρήθηκε μείωση της παραγωγής τα τελευταία χρόνια.

Τα 2/3 της σοδειάς πορτοκαλιών που παράγονται στην Βραζιλία προορίζονται για την παραγωγή χυμού, το 80 % του οποίου εξάγεται. Έτσι, η μειωμένη ζήτηση για εξαγωγή και το αυξημένο κόστος παραγωγής των χυμών είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των τιμών των φρέσκων πορτοκαλιών.

Λαμβάνοντας υπόψη πως το πλήθος των πορτοκαλόδεντρων, για παράδειγμα στο Σάο Πάολο, έχει μειωθεί, ο ετήσιος ρυθμός παραγωγής υπολογίστηκε περίπου στο 0.9 %, με την συνολική παραγωγή να φτάσει τα 20.1 εκατομμύρια τόνους μέχρι το 2023.

Γενικά, η παραγωγικότητα και η οικονομική αποτελεσματικότητα είναι τα βασικά σημεία που θα καθορίσουν την μελλοντική αύξηση της παραγωγής.⁵

ΗΠΑ

Σημαντική μείωση έως περίπου 30 % στην παραγωγή πορτοκαλιών παρατηρήθηκε στις ΗΠΑ που αποτελούν τον δεύτερο μεγαλύτερο παραγωγό παγκοσμίως. Αυτό οφείλεται κυρίως σε μια ασθένεια που έπληξε τα δέντρα και κατέστρεψε τους καρπούς, στην πολιτεία της Φλόριντα που διαθέτει και τις περισσότερες καλλιέργειες. Πιο συγκεκριμένα, από το 2004 που εμφανίστηκε η ασθένεια χάθηκε σχεδόν η μισή παραγωγή που προερχόταν από την Φλόριντα.

Εφόσον έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες για την συγκεκριμένη ασθένεια και γίνονται προσπάθειες για τον περιορισμό αυτής, η παραγωγή αναμένεται να ανέλθει στα 6.8 εκατομμύρια τόνους το 2023, η οποία είναι χαμηλότερη από αυτή της περιόδου 2011-2013, αλλά μεγαλύτερη από τα 6.4 εκατομμύρια το 2014-2015.⁵

Κίνα

Η παραγωγή πορτοκαλιών στην Κίνα εμφάνισε ραγδαία άνοδο τις τελευταίες δεκαετίες. Το 2011-2013 η παραγωγή έφτασε τα 6.6 εκατομμύρια τόνους σχεδόν διπλάσια ποσότητα από το 2001-2003.

Το 85 % της παραγωγής καταναλώνεται ως φρέσκο φρούτο με αποτέλεσμα τα κόστη της αποθήκευσης και των μεταφορών να αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την περαιτέρω ανάπτυξη του τομέα. Ακόμη, το κόστος παραγωγής αυξήθηκε σημαντικά, οδηγώντας τους καλλιεργητές είτε να σταματήσουν την παραγωγή είτε να μην την επιλέξουν.

Αναμένεται, λοιπόν, η αύξηση της παραγωγής να πέσει στο 1.7 % ετησίως, πολύ πιο κάτω από το 7 % που είχε σημειωθεί τα προηγούμενα χρόνια. Έτσι, το 2023 θα παραχθούν περίπου 7.8 εκατομμύρια τόνοι πορτοκαλιών και η Κίνα θα αποτελεί πλέον τη δεύτερη μεγαλύτερη παραγωγό πορτοκαλιών στον κόσμο.⁵

Άλλες χώρες – παραγωγοί

Κατά την περίοδο 2011-2013, οι χώρες της Μεσογείου κατείχαν το 20 % της παγκόσμιας παραγωγής πορτοκαλιών, δηλαδή 12.8 εκατομμύρια τόνους. Μερικές από τις κυριότερες χώρες παραγωγής της περιοχής όπως η Ελλάδα, η Ισπανία και το Μαρόκο παρουσίασαν αργή ανάπτυξη, ενώ κάποιες άλλες όπως η Αίγυπτος, η Ιταλία και η Τουρκία με την βοήθεια κρατικών επιχορηγήσεων και την καλλιέργεια

νέων ποικιλιών σημείωσαν σταθερή ανάπτυξη στον τομέα. Έως το 2023 η παραγωγή θα ανέλθει στα 14.7 εκατομμύρια τόνους.

Άλλες χώρες που πρόκειται να εμφανίσουν ανάπτυξη στον τομέα της καλλιέργειας των πορτοκαλιών είναι η Ινδία, το Μεξικό, το Πακιστάν και η Νότια Αφρική.⁵

1.4 Εμπόριο φρέσκων πορτοκαλιών

Το εμπόριο φρέσκων πορτοκαλιών εμφανίζει σταθερή αύξηση την τελευταία δεκαετία με την αναλογία του παγκόσμιου εμπορίου προς την παραγωγή να έχει αυξηθεί, από 8% το 2001-2003 σε 10% το 2011-2013. Η υψηλότερη ζήτηση καταγράφεται στη Ρωσία και την Ανατολική Ευρώπη γεγονός που απορρέει από την αύξηση των εισοδημάτων των νοικοκυριών, τη στροφή σε μια πιο υγιεινή διατροφή, την τεχνολογική πρόοδο και τη διευκόλυνση της αποθήκευσης και της μεταφοράς των αγαθών. Ο κύριος όγκος των πορτοκαλιών προέρχεται από το βόρειο ημισφαίριο, περίπου 80%, με τη Μεσόγειο να κατέχει το 50% της παραγωγής. Αντίστοιχα, χώρες του νοτίου ημισφαιρίου όπως η Αργεντινή και η Αυστραλία συμβάλλουν παρέχοντας φρέσκα πορτοκάλια όταν δεν είναι η εποχή τους, στον Βορρά.

Οι διανομή των πορτοκαλιών, όπως είναι λογικό, έχει επηρεαστεί τόσο από τις γεωγραφικές θέσεις στις οποίες πρέπει να φτάσουν όσο και από τις εμπορικές συμφωνίες. Έτσι, οι κυριότεροι προορισμοί για την παραγωγή της Μεσογείου είναι οι χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και της Μέσης Ανατολής και η Ρωσία. Αντίστοιχα, η παραγωγή των ΗΠΑ προορίζεται για την Ιαπωνία, τον Καναδά και τη Νότια Κορέα.

Οι κορυφαίοι εξαγωγείς είναι η Ισπανία, η Αίγυπτος και η Νότια Αφρική με πάνω από ένα εκατομμύριο τόνους να εξάγονται από την κάθε χώρα. Η Ισπανία θα παραμείνει ο μεγαλύτερος εξαγωγέας παγκοσμίως με περίπου 1.8 εκατομμύρια τόνους να εξάγονται κάθε χρόνο έως το 2023. Αυξημένη προβλέπεται να είναι η ζήτηση από την ΕΕ, την Ουκρανία και τη Μέση Ανατολή, ενώ εφόσον η Ρωσία έχει απαγορεύσει την εισαγωγή προϊόντων από την Ισπανία, την Ελλάδα και την Ιταλία, τις ανάγκες της θα κληθεί να καλύψει η Αίγυπτος αυξάνοντας τις εξαγωγές της. Πιο συγκεκριμένα, οι εξαγωγές της Αιγύπτου θα φτάσουν τους 1.3 εκατομμύρια τόνους έως το 2023, δηλαδή 44% περισσότερο σε σχέση με τον μέσο όρο του διαστήματος 2011-2013. Παράλληλα, και η Νότια Αφρική αναμένεται να εμφανίσει σταθερή άνοδο στις εξαγωγές της, φτάνοντας τους 1.2 εκατομμύρια τόνους πορτοκαλιών έως το 2023. Όσον αφορά στις ΗΠΑ, τα φρέσκα πορτοκάλια προορίζονται κυρίως για εξαγωγή, καθώς η εγχώρια ζήτηση είναι χαμηλή. Μάλιστα, λόγω των προβλημάτων άρδευσης στην Καλιφόρνια και της ασθένειας που έχει πλήξει τα πορτοκαλόδεντρα στην Φλόριντα, οι εξαγωγές θα περιοριστούν στους 650000 τόνους μέχρι το 2023.⁵

Διαθεσιμότητα σε παγκόσμιο και εγχώριο επίπεδο

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα στοιχεία που αφορούν την παραγωγή, τις εισαγωγές και εξαγωγές πορτοκαλιών σε παγκόσμιο επίπεδο.

Πίνακας 1: Στατιστικά στοιχεία παγκόσμιας παραγωγής πορτοκαλιών (χιλιάδες τόνοι)⁶

	2017	2018	2019
Αφρική	9 369.9	9 436.0	8 833.7
Ασία	24 603.7	25 222.9	28 920.0
Καραϊβική	375.6	383.0	333.9
Κεντρική Αμερική	5 671.3	5 645.3	5 728.9
Ευρώπη	6 056.5	6 465.4	6 098.5
Βόρεια Αμερική	4 616.0	3 560.0	4 832.6

Ωκεανία	341.9	388.0	355.2
Νότια Αμερική	20 440.3	19 741.0	20 189.8
Παγκοσμίως	71 475.1	70 841.5	76 292.6

Πίνακας 2: Στατιστικά στοιχεία παγκόσμιας εισαγωγής πορτοκαλιών (χιλιάδες τόνοι)⁶

	2017	2018	2019
Αφρική	106.1	146.2	98.0
Ασία	2 416.7	2 631.1	2 563.2
Καραϊβική	6.0	3.7	3.8
Κεντρική Αμερική	151.8	160.7	145.5
Ευρώπη	3 957.5	3 860.1	3 906.6
Βόρεια Αμερική	370.2	383.7	376.7
Ωκεανία	35.8	35.6	26.7
Νότια Αμερική	72.7	68.7	76.7
Παγκοσμίως	7 116.9	7 289.8	7 193.6

Πίνακας 3: Στατιστικά στοιχεία παγκόσμιας εξαγωγής πορτοκαλιών (χιλιάδες τόνοι)⁶

	2017	2018	2019
Αφρική	2 799.1	3 761.3	3 034.9
Ασία	815.8	957.9	709.1
Καραϊβική	3.2	3.2	2.7
Κεντρική Αμερική	210.7	150.7	138.4
Ευρώπη	2 672.6	2 680.0	2 809.7
Βόρεια Αμερική	588.1	588.3	484.3
Ωκεανία	190.8	185.7	199.6
Νότια Αμερική	264.4	261.3	317.8
Παγκοσμίως	7 544.8	8 588.5	7 696.6

Πίνακας 4: Στατιστικά στοιχεία για την χρήση πορτοκαλιών για παραγωγή επεξεργασμένων προϊόντων (χιλιάδες τόνοι)⁶

	2017	2018	2019
Αργεντινή	375.0	307.0	194.0
Αυστραλία	215.0	210.0	205.0
Βραζιλία	10 975.0	14 362.0	10 159.0
Κίνα	570.0	520.0	400.0
Κόστα Ρίκα	232.0	216.0	215.0
Αίγυπτος	100.0	360.0	335.0
Ευρωπαϊκή Ένωση	1 154.0	1 349.0	1 052.0
Ισραήλ	30.0	23.0	28.0

Μεξικό	1 900.0	2 200.0	900.0
Μαρόκο	50.0	60.0	35.0
Νότια Αφρική	239.0	333.0	282.0
Τουρκία	98.0	105.0	110.0
ΗΠΑ	2 010.0	3 378.0	3 024.0

Όσον αφορά στην Ελλάδα, δεν γίνονται εισαγωγές πορτοκαλιών. Τα στατιστικά στοιχεία για την παραγωγή και τις εξαγωγές παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Πίνακας 5: Στατιστικά στοιχεία παραγωγής και εξαγωγών στην Ελλάδα (χιλιάδες τόνοι)⁶

	2017	2018	2019
Παραγωγή	727.5	866.1	849.1
Εξαγωγές	277.3	313.8	264.4

Στην Ελλάδα, οι περιοχές παραγωγής είναι η Πελοπόννησος και η Δυτική Ελλάδα (Αιτωλοακαρνανία, Άρτα), η Κρήτη και η Χίος.⁴ Οι καλλιεργούμενες εκτάσεις με πορτοκάλια κατά το 2019 ανέρχονταν στα 294.5 χιλ. στρέμματα, αυξήθηκαν κατά 0.5% σε σχέση με το 2018.⁷

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΧΥΜΟΣ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΟΥ

2.1 Εισαγωγή

Η κατανάλωση χυμού πορτοκαλιού γνώρισε σταθερή αύξηση μετά τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, αφού έγινε αναπόσπαστο κομμάτι του πρωινού γεύματος τόσο στις ΗΠΑ όσο και σε χώρες της Ευρώπης. Μέχρι το 2000, σχεδόν το 40% της παραγωγής πορτοκαλιών προοριζόταν για την παραγωγή χυμού.

Την τελευταία δεκαετία έχουν δημιουργηθεί διάφορα καινοτόμα προϊόντα με γνώμονα την ανάδειξη της γεύσης του πορτοκαλιού, αλλά με χαμηλή περιεκτικότητα σε χυμό πορτοκαλιού. Η ζήτηση αυτών των προϊόντων, όπως και της παραγωγής 100% χυμού πορτοκαλιού φαίνεται να είναι αυξημένη στην Ασία και κυρίως στην Κίνα όπου η κατανάλωση χυμού πορτοκαλιού αυξανόταν κατά 34% ετησίως το διάστημα 2001-2013.

Αντίθετα, στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη σημαντική είναι η μείωση της ζήτησης. Στις ΗΠΑ η κατανάλωση χυμού ανά άτομο μειώθηκε κατά 40%. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην αλλαγή των διατροφικών συνηθειών, στους γρήγορους ρυθμούς ζωής που αφήνουν λίγο χρόνο για πρωινό, στην πληθώρα αναψυκτικών και ποτών που υπάρχουν στην αγορά και στις αυξημένες τιμές των χυμών με περιεκτικότητα σε πορτοκάλι 100%.

Με βάση τις προβλέψεις η παγκόσμια κατανάλωση χυμού πορτοκαλιού θα φτάσει τους 23.1 εκατομμύρια τόνους σε νωπό ισοδύναμο μέχρι το 2023. Η Βραζιλία θα παραμείνει η μεγαλύτερη παραγωγός χυμού πορτοκαλιού στον κόσμο και η Κίνα, η ΕΕ και οι ΗΠΑ θα συνεχίσουν να αποτελούν τους κυριότερους εισαγωγείς.⁵

2.2 Βιομηχανίες παραγωγής χυμών πορτοκαλιού

2.2.1 Προϊόντα βιομηχανιών παραγωγής χυμών πορτοκαλιού

Τα εργοστάσια επεξεργασίας πορτοκαλιών προκειμένου να αξιοποιήσουν το μεγαλύτερο ποσοστό του πορτοκαλιού, παράγουν μεγάλη ποικιλία προϊόντων. Κάποια από τα προϊόντα είναι τα παρακάτω⁸:

- Φυσικός χυμός μη συμπυκνωμένος (Not From Concentrate – NFC)
- Συμπυκνωμένος χυμός: με εξάτμιση, κατάψυξη και αντίστροφη όσμωση
- Σακχαρούχος χυμός
- Παγωμένος χυμός: παρόμοιος με φρέσκο χυμό, πέρασμα από κόσκινο και άμεσο πάγωμα ή προσθήκη κρύου χυμού και ασηπτική διεργασία
- Υπολείμματα (παραπροϊόντα): αιθέρια έλαια, πούλπα (παρασκευή μαρμελάδας, μελάσας, πηκτίνης)

2.2.2 Διαδικασία παραγωγής χυμού πορτοκαλιού

1^ο στάδιο: Συγκομιδή, μεταφορά, πλύσιμο και διαλογή

Μετά την συγκομιδή των πορτοκαλιών, φορτώνονται και μεταφέρονται στα εργοστάσια επεξεργασίας. Η εκφόρτωση των φρούτων γίνεται απευθείας σε έναν μεταφορέα που τα οδηγεί στον σταθμό πρόπλυσης. Εκεί, αφαιρούνται οι σκόνες, οι βρωμιές και τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων. Στη συνέχεια, οδηγούνται στο τραπέζι διαλογής για να απομακρυνθούν τα φύλλα και τα κλαδιά. Οι σάπιοι και κατεστραμμένοι καρποί απομακρύνονται χειρωνακτικά.

Ακόμη, γίνεται δειγματοληψία από κάθε φορτηγό προκειμένου να προσδιοριστούν κάποια πρωταρχικά χαρακτηριστικά όπως η οξύτητα, η απόδοση σε χυμό και το χρώμα. Τα πορτοκάλια αποθηκεύονται σε ειδικά σχεδιασμένα δοχεία για όσο το δυνατόν μικρότερο χρονικό διάστημα και από εκεί πριν την εκχύμωσή τους οδηγούνται για ένα τελευταίο πλύσιμο και οπτικό έλεγχο.⁹

2^ο στάδιο: Εκχύμωση

Στόχος της διαδικασίας εκχύλισης χυμού είναι να ληφθεί όσο το δυνατόν περισσότερος χυμός από τον καρπό αποφεύγοντας παράλληλα την ύπαρξη ελαίων και άλλων συστατικών του φρούτου να εισέλθουν στον χυμό. Τα συστατικά αυτά μπορεί να οδηγήσουν σε πικρή γεύση ή σε άλλα ελαττώματα αργότερα κατά την αποθήκευση του χυμού.

Για την βελτιστοποίηση της απόδοσης του αποχυμωτή, τα ακατέργαστα φρούτα ταξινομούνται ανάλογα με το μέγεθος, διότι οι μεμονωμένοι αποχυμωτές είναι ρυθμισμένοι να χειρίζονται φρούτα μόνο ορισμένου μεγέθους.

Υπάρχουν δύο τύποι αποχυμωτών, ο αποχυμωτής συμπίεσης FMC και ο αποχυμωτής τύπου τρυπανιού Brown. Το σύστημα εκχύλισης τύπου τρυπανιού παρέχει άριστο διαχωρισμό των συστατικών του πορτοκαλιού, δηλαδή του χυμού, των ελαίων και της φλούδας. Λειτουργεί καλύτερα όσον αφορά την ποιότητα του προϊόντος και την απόδοση. Οι αποχυμωτές τύπου συμπιεστή είναι λιγότερο ευαίσθητοι στο μέγεθος και το σχήμα του φρούτου, αλλά μπορεί να οδηγήσουν σε υψηλότερη περιεκτικότητα σε έλαια στο χυμό και σε πιο κατεστραμμένο πολτό από ό,τι με εκχυμωτές τύπου τρυπανιού.

Ένας άλλος τύπος είναι ο περιστροφικός αποχυμωτής περιστροφικής πρέσας. Σε αυτούς τα φρούτα κόβονται στη μέση και τα μισά περνούν ανάμεσα σε περιστρεφόμενους κυλίνδρους που πιέζουν τον χυμό. Τα έλαια εξάγονται από την φλούδα σε ξεχωριστό στάδιο πριν από την εκχύλιση. Αν και η

διαδικασία εκχύλισης είναι απλή, τόσο η απόδοση σε χυμό όσο και η ποιότητα του χυμού είναι χαμηλότερη από εκείνη που λαμβάνεται με τους αποχυμωτές τύπου συμπιεστή και τρυπανιού.⁹

3° στάδιο: Φιλτράρισμα χυμού

Ο χυμός που εξέρχεται από τη διαδικασία εκχύλισης φιλτράρεται, επειδή περιέχει πολλή πούλπα για να οδηγηθεί στον εξατμιστήρα ή ως NFC (Not From Concentrate) χυμός, δηλαδή μη συμπυκνωμένος. Για την διαδικασία του φιλτραρίσματος χρησιμοποιούνται κόσκινα, φίλτρα ή φυγοκέντρωση για να απομακρυνθεί η πούλπα από τον χυμό.

Μετά από αυτόν τον καθαρισμό, ο χυμός συχνά υφίσταται σε κάποιο βαθμό ανάμειξη με χυμό από άλλες παρτίδες προκειμένου να εξισορροπηθούν η γεύση, το χρώμα και η οξύτητα πριν από την περαιτέρω επεξεργασία. Εάν προορίζεται για NFC παραγωγή χυμού, ο χυμός που εξέρχεται από τα φίλτρα θα πρέπει να ψύχεται στους 4°C για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα μικροβιολογικής δραστηριότητας.⁹

4° στάδιο: Παραγωγή μη συμπυκνωμένου χυμού

Στόχος της επεξεργασίας χυμού NFC είναι η παραγωγή χυμού πορτοκαλιού με την ελάχιστη δυνατή θερμική επεξεργασία. Ωστόσο, η θερμική επεξεργασία πρέπει να είναι επαρκής ώστε να διασφαλίζεται η φυσική και μικροβιολογική σταθερότητα του προϊόντος. Δεδομένου ότι η συγκομιδή των φρούτων είναι εποχιακή και η κατανάλωση χυμού γίνεται όλο το χρόνο, το προϊόν πρέπει να είναι αρκετά σταθερό ώστε να μπορεί να αποθηκευτεί για αρκετούς μήνες έως και ένα έτος. Σε ορισμένες περιπτώσεις, κατά τη διάρκεια της περιόδου, ο χυμός NFC παστεριώνεται και συσκευάζεται για τη λιανική αγορά. Συνήθως, γίνεται η επεξεργασία του χυμού και αποθηκεύεται χύμα υπό ασηπτικές συνθήκες κατάψυξης για μερικούς μήνες μέχρι την επανεπεξεργασία και τη συσκευασία του. Η επανεπεξεργασία περιλαμβάνει συχνά την ανάμειξη χυμού από φρούτα πρώιμης και όψιμης εποχής προκειμένου να σταθεροποιηθούν οι βαθμοί Brix, η αναλογία, το χρώμα κ.λπ.

Τα στάδια μέχρι την αποθήκευση του NFC χυμού είναι τα εξής:

Απελαίωση: Ανάλογα με την ποικιλία των φρούτων και τη λειτουργία του αποχυμωτή, η περιεκτικότητα σε έλαια στον χυμό μπορεί να υπερβαίνει τις αποδεκτές ποσότητες. Τα επίπεδα μπορεί να είναι καθορίζονται από ένα νομικό πρότυπο ή μπορεί να αποφασίζονται με βάση την προτίμηση των καταναλωτών. Τα αποδεκτά επίπεδα ελαίου σε χυμό έτοιμο για κατανάλωση κυμαίνονται από 0.015 έως 0.030%. Η μείωση του ελαίου μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, όπως περιορίζοντας την πίεση κατά την εκχύμωση, μέσω της εκχύλισης χυμού υπό κενό ή χρησιμοποιώντας φυγοκέντρωση, διαδικασία που δεν απαιτεί την θέρμανση του χυμού.

Παστερίωση: Κατά την παστερίωση επιτυγχάνονται δύο στόχοι: η αδρανοποίηση των ενζύμων που υπάρχουν στον χυμό και η μικροβιολογική σταθερότητά του. Η παστερίωση γίνεται αρχικά πριν την αποθήκευση του χυμού σε μεγάλες ποσότητες και έπειτα πριν συσκευασθεί ο χυμός για λιανική πώληση. Ειδικότερα, για τον χυμό NFC απαιτείται μεγαλύτερη προσοχή αφού είναι περισσότερο ευαίσθητος στα μικρόβια σε σχέση με τον συμπυκνωμένο χυμό που λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα η μικροβιακή ανάπτυξη σε αυτόν επιβραδύνεται. Η θερμική επεξεργασία πρέπει να γίνεται σε καλά σχεδιασμένους εναλλάκτες θερμότητας προκειμένου ο χυμός να μην υφίσταται «σοκ» λόγω της διαφοράς θερμοκρασίας.

Απαέρωση: Το διαλυμένο στον χυμό οξυγόνο ή οι φυσαλίδες αέρα που υπάρχουν σε αυτόν μπορούν να καταστρέψουν σημαντική ποσότητα της διαθέσιμης βιταμίνης C μέσω της οξειδωσης. Ακόμη, η ύπαρξη οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει στην ανεπαρκή θερμική επεξεργασία κατά την παστερίωση. Η απαέρωση

πραγματοποιείται με διέλευση του χυμού μέσα από έναν θάλαμο κενού, όπου οι φυσαλίδες διαστέλλονται και τελικά διαφεύγουν εύκολα.

Μακροπρόθεσμη αποθήκευση: Μετά την πρωτογενή παστερίωση, ο χυμός πορτοκαλιού αποθηκεύεται χύμα υπό κατεψυγμένες ή ασηπτικές συνθήκες. Η αποικοδόμηση βιταμινών και οι αλλαγές στη γεύση κατά τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης ελαχιστοποιούνται με την κατάψυξη. Η αποθήκευση σε κατάψυξη του χυμού NFC είναι καταλληλότερη για μικρότερες ποσότητες προϊόντος NFC. Το κατεψυγμένο προϊόν διατηρείται συνήθως στους -18°C ή χαμηλότερα. Η απόψυξη του χυμού NFC για να είναι έτοιμος για τελική επεξεργασία εμφανίζει δυσκολίες. Χρειάζονται αρκετές ημέρες ή εβδομάδες για να ξεπαγώσει το προϊόν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το εξωτερικό στρώμα του χυμού μπορεί να εκτεθεί σε μικροβιολογική μόλυνση κατά την απόψυξη, με επακόλουθο αρνητικό αντίκτυπο στην ποιότητα του προϊόντος. Τα συστήματα θραύσης επιτρέπουν ταχύτερο χειρισμό αλλά συνεπάγονται υψηλότερη κατανάλωση ενέργειας και επένδυση κεφαλαίου.

Ασηπτική αποθήκευση: Ως εναλλακτική λύση στην κατεψυγμένη αποθήκευση, το προϊόν NFC μπορεί να ψύχεται σε ασηπτικές δεξαμενές. Χρησιμοποιούνται συγκεκριμένες τεχνικές κατασκευής για την επικάλυψη της εσωτερικής επιφάνειας των δεξαμενών. Οι δεξαμενές αποστειρώνονται πριν γέμισμά τους με ένα αποστειρωτικό υγρό. Η προτιμώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης είναι περίπου 1°C , λίγο πάνω από τη θερμοκρασία κατάψυξης του χυμού. Ο χυμός πρέπει να αναδεύεται περιοδικά για να αποφεύγεται η διαχωρισμού ή βύθισης του πολτού και για να διατηρηθεί η ομοιομορφία Brix. Άζωτο υπό πίεση πάνω από την επιφάνεια του χυμού χρησιμοποιείται συχνά για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου εμφάνισης βιταμινών C μέσω οξειδωσης. Κανονικά, όταν το προϊόν απαιτείται από αυτές τις δεξαμενές, αφαιρείται, αναμειγνύεται με χυμό από άλλο μέρος της περιόδου (και ίσως πολτό) και επαναπαστεριάζεται.⁹

Παραγωγή συμπυκνωμένου χυμού

Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο περισσότερος χυμός πορτοκαλιού παράγεται ως συμπύκνωμα. Ο χυμός από το στάδιο του καθαρισμού εξατμίζεται για την απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους του νερού. Ο πιο συνηθισμένος τύπος σωληνωτού συστήματος εξατμιστή που χρησιμοποιείται για χυμό πορτοκαλιού είναι ο εξατμιστής TASTE (Thermally Accelerated Short Time Evaporator). Ο χυμός αρχικά προθερμαίνεται στους $95-98^{\circ}\text{C}$. Η παραμονή στη θερμοκρασία παστερίωσης σταθεροποιεί το χυμό μέσω της αδρανοποίησης μικροβίων και ενζύμων. Στη συνέχεια, το προϊόν διέρχεται από διάφορα στάδια υπό κενό έως ότου επιτευχθεί συγκέντρωση έως 66°Brix . Μέχρι τότε η θερμοκρασία του προϊόντος έχει πέσει σε περίπου 40°C . Ο χρόνος παραμονής στον εξατμιστή είναι συνήθως πέντε έως επτά λεπτά.⁹

2.2.3 Μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας χυμού πορτοκαλιού

Τα τελευταία χρόνια η κατανάλωση χυμών φρούτων αυξήθηκε καθώς υπάρχουν επιδημιολογικά στοιχεία ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών είναι ευεργετική για την υγεία. Η θερμική επεξεργασία που υφίσταται παραδοσιακά ο πορτοκαλοχυμός για να καταστραφούν οι μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοίωση και για να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα που περιορίζουν την ποιότητα και την διάρκεια ζωής του προϊόντος, επιφέρει αλλαγές στο χρώμα, τη γεύση και την θρεπτική αξία του χυμού.¹⁰ Έτσι, βασικός στόχος των βιομηχανιών παραγωγής και επεξεργασίας χυμών φρούτων και λαχανικών είναι η ασφάλεια των χυμών και η διατήρηση των οργανοληπτικών και διατροφικών τους ιδιοτήτων με την χρήση νέων πιο ήπιων μεθόδων επεξεργασίας.

Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία

Τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία (High-intensity pulsed electric fields – HIPEF) είναι μια νέα μη θερμική τεχνολογία που σε συνδυασμό με άλλες επεξεργασίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία

χυμών εσπεριδοειδών.¹⁰ Κατά τη διεργασία αυτή, γίνεται εφαρμογή παλμών υψηλής τάσης (20 – 80 kV/cm) σε τρόφιμα που τοποθετούνται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Η διεργασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περίπου ίση με εκείνη του περιβάλλοντος και διαρκεί μερικά δευτερόλεπτα.¹¹ Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, ο χρόνος επεξεργασίας, το πλάτος του παλμού, η συχνότητα, η πολικότητα κ.α.^{12 13}

Σύμφωνα με μελέτες, με χρήση της μεθόδου HIPEF η μικροβιακή αδρανοποίηση μπορεί να φτάσει στα ίδια επίπεδα που επιτυγχάνονται και με την παστερίωση. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε σύγκριση με την θερμική επεξεργασία, η μέθοδος HIPEF οδήγησε σε καλύτερη διατήρηση των επιπέδων της βιταμίνης C στον πορτοκαλοχυμό.^{10 14}

Υπερψηλή Πίεση

Η διεργασία της υπερψηλής υδροστατικής πίεσης (ΥΥΠ) αποτελεί μια καινοτόμο μέθοδο επεξεργασίας των τροφίμων για την συντήρησή τους, κατά την οποία εφαρμόζονται πιέσεις από 100 έως 900 MPa σε υγρά ή στερεά, συσκευασμένα ή μη συσκευασμένα, τρόφιμα. Κατά τη διάρκεια της διεργασίας, η θερμοκρασία μπορεί να είναι μικρότερη από 0 °C έως και μεγαλύτερη των 100 °C. Με την εφαρμογή υπερψηλής υδροστατικής πίεσης επιτυγχάνεται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας και του μικροβιακού φορτίου. Παράλληλα, η αλλοίωση των θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών είναι πολύ μικρότερη από τις συμβατικές θερμικές μεθόδους συντήρησης. Επομένως, το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η παραγωγή ανώτερων ποιοτικά προϊόντων, με αυξημένη αποδοχή από τον καταναλωτή που πλησιάζουν όσο το δυνατόν περισσότερο τα χαρακτηριστικά των αντίστοιχων φρέσκων προϊόντων.¹¹

Ακτινοβολία

Η ακτινοβολία προκαλεί αμελητέες απώλειες θρεπτικών συστατικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στα τρόφιμα σε σχέση με την θερμική επεξεργασία, καθώς δεν αυξάνεται σημαντικά η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών με ακτινοβολία οφείλεται κυρίως σε αλλοιώσεις του DNA, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι αναπαραγωγικές ικανότητες και άλλες λειτουργίες του κυττάρου.¹⁵ Για την επεξεργασία του χυμού πορτοκαλιού έχει εφαρμοστεί η υπεριώδης ακτινοβολία (UV ηλεκτρομαγνητικό φάσμα 200 – 280 nm) για την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών.¹¹

Υπέρηχοι

Η μέθοδος των υπερήχων έχει αναφερθεί ότι είναι αποτελεσματική κατά των παθογόνων μικροοργανισμών που βρίσκονται στον χυμό πορτοκαλιού. Κατά την δράση των υπερήχων δημιουργούνται ενδοκυτταρικές κοιλότητες (σηπλάιωση), δηλαδή διαρρηγνύονται τα δομικά και λειτουργικά συστατικά του κυττάρου μέχρι την λύση και του ίδιου. Λόγω της προστατευτικής φύσης των τροφίμων, οι υπέρηχοι χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους συντήρησης, όπως η θέρμανση.^{11 16}

2.3 Υπολείμματα βιομηχανιών χυμοποίησης πορτοκαλιών

Κατά την παραγωγή χυμού πορτοκαλιού, περίπου το 50-60% του επεξεργασμένου φρούτου αποτελείται από τις φλούδες, τους σπόρους και την πούλπα. Αυτά τα υπολείμματα και τα πορτοκάλια που κατά την διαδικασία της διαλογής έχουν κριθεί ακατάλληλα αποτελούν τα απόβλητα μιας βιομηχανίας παραγωγής χυμού πορτοκαλιού.¹⁷ Τα απόβλητα αυτά μπορούν να ρυπάνουν τα υπόγεια ύδατα, γι' αυτό είναι αναγκαία είτε η περεταιρω επεξεργασία τους είτε η διάθεσή τους σε χώρους υγειονομικής ταφής

απορριμμάτων, λύσεις που είναι δαπανηρές. Έτσι, πολλές βιομηχανίες στρέφονται στην διάθεση αυτών των υπολειμμάτων για την παραγωγή ζωοτροφών για βοοειδή.¹⁸ Ακόμη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή οργανικών λιπασμάτων, πηκτίνης, βιοελαίου, αιθέριων ελαίων και αντιοξειδωτικών ενώσεων, ή ως υπόστρωμα για την παραγωγή διαφόρων ενώσεων με υψηλή προστιθέμενη αξία, όπως μικροβιακές πρωτεΐνες, οργανικά οξέα, αιθανόλη, ένζυμα και βιολογικά ενεργούς δευτερογενείς μεταβολίτες και προσροφητικά υλικά.¹⁹ Με αναερόβια χώνευση, κατά την οποία μπορεί να επιτευχθεί τόσο ο έλεγχος της ρύπανσης όσο και η ανάκτηση ενέργειας, είναι άλλος ένας πιθανός τρόπος επεξεργασίας και αξιοποίησης των άφθονων αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού. Αυτή η διαδικασία ορίζεται ως η βιολογική μετατροπή του οργανικού υλικού σε μια ποικιλία τελικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένου του βιοαερίου.²⁰

Γενικά, με την αξιοποίηση των παραπροϊόντων εφαρμόζοντας τις εναλλακτικές που προαναφέρθηκαν, θα λυθούν τα περιβαλλοντικά ζητήματα που προκύπτουν και θα ωφεληθούν οι βιομηχανίες καθώς τα απόβλητά τους θα αποκτήσουν προστιθέμενη αξία.

2.3.1 Στερεά απόβλητα χυμοποιείων

Οι βιομηχανίες επεξεργασίας πορτοκαλιών παράγουν σε κάθε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας σημαντικές ποσότητες οργανικών στερεών αποβλήτων. Τα απόβλητα αυτά προκύπτουν κυρίως κατά τα στάδια του καθαρισμού, της αποφλοιώσης, του τεμαχισμού, της διαλογής, της πολτοποίησης και του στραγγίσματος και συμπεριλαμβάνουν τους φλοιούς των πορτοκαλιών, τους σπόρους, τους πυρήνες και τα φύλλα. Αποτελούν το 45 -60% του καρπού. Η απόρριψή τους αποτελεί κίνδυνο για το περιβάλλον, λόγω του μεγάλου όγκου και της περιεκτικότητάς τους σε υγρασία, που τα καθιστά κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροβίων. Όταν υποστούν την κατάλληλη επεξεργασία όπως είναι η ξήρανση μπορούν να αποφευχθούν αυτά τα προβλήματα.^{21 22} Συνήθως χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές ή λιπάσματα.²¹

Φλούδες

Οι φλούδες προκύπτουν κατά το στάδιο της αποφλοιώσης, όπου διαχωρίζεται το εσωτερικό του φρούτου από τον εξωτερικό φλοιό. Η διαδικασία της αποφλοιώσης πραγματοποιείται είτε μηχανικά είτε χειρωνακτικά. Οι φλοιοί των πορτοκαλιών αποτελούν καλή πηγή κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και φαινολικών ενώσεων.²¹

Πυρήνες

Οι σπόροι απομακρύνονται κατά τα στάδια της πολτοποίησης και της εκχύμωσης. Οι σπόροι των φρούτων περιέχουν πολλά θρεπτικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες και λιπίδια.²¹

2.3.2 Χαρακτηρισμός στερεών υπολειμμάτων πορτοκαλιού και φυσικοχημικές ιδιότητες

Η παραγωγή εσπεριδοειδών παγκοσμίως αναπτύσσεται συνεχώς τις τελευταίες δεκαετίες. Πιο συγκεκριμένα, τα πορτοκάλια αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής εσπεριδοειδών, αντιπροσωπεύοντας περισσότερο από το ήμισυ της παγκόσμιας παραγωγής. Μεγάλο μέρος αυτής της παραγωγής προορίζεται για τη βιομηχανική εξαγωγή χυμού εσπεριδοειδών, η οποία οδηγεί σε τεράστιες ποσότητες υπολειμμάτων. Η διαχείριση των αποβλήτων, τα οποία παράγουν οσμές και ρύπανση του εδάφους, αποτελεί μείζον πρόβλημα για τις εμπλεκόμενες βιομηχανίες.²³

Οι διαλυτοί και αδιάλυτοι υδατάνθρακες που περιέχονται στα παραπροϊόντα των βιομηχανιών παραγωγής χυμού πορτοκαλιού τα καθιστούν ενδιαφέρουσα πιθανή πρώτη ύλη για προϊόντα προστιθέμενης αξίας, με προκαταρκτική χημική ή ενζυμική υδρόλυση και επακόλουθη βιολογική μετατροπή. Τα διαλυτά σάκχαρα που περιέχονται στη φλούδα πορτοκαλιού είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη, ενώ οι αδιάλυτοι πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων της είναι βασικά κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη. Η ημικυτταρίνη αποτελείται κυρίως από μονάδες ξυλόζης συνδεδεμένες μεταξύ τους με β-1,4 δεσμούς, αλλά μπορεί επίσης να περιέχει εξόζες και σακχαρούχα οξέα (π.χ. ουρονικό οξύ), ενώ η πηκτίνη αποτελείται κυρίως από ουρονικά οξέα και άλλα σάκχαρα όπως η ραμνόζη και η γαλακτόζη.

Η ενζυμική υδρόλυση αυτού του υπολείμματος με ακατέργαστα εμπορικά παρασκευάσματα που περιέχουν πηκτινάσες, κυτταρινάσες, αλλά και ημικυτταρινάσες, απελευθερώνει γλυκόζη από την κυτταρίνη, ουρονικά οξέα από την πηκτίνη και αραβινόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη και ξυλόζη τόσο από την πηκτίνη όσο και από τις ημικυτταρινάσες. Μεγάλες ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης που παρασύρονται στους ιστούς της φλούδας απελευθερώνονται επίσης μαζί με ορισμένες ανασταλτικές ενώσεις, κυρίως υπολειμματικό λιμονένιο, το οποίο πρέπει να απομακρυνθεί πριν προχωρήσουν οι ζυμώσεις.²³

Επίσης, όπως έχει αποδειχθεί τα εσπεριδοειδή και τα προϊόντα τους είναι πλούσιες πηγές διαιτητικών ινών, και βιοενεργών συστατικών (βιταμινών, φλαβονοειδών και καροτονοειδών)²⁴ με αντιοξειδωτικές δράσεις χρήσιμα για τον ανθρώπινο οργανισμό.²⁵

Πίνακας 6: Σύσταση φλοιού πορτοκαλιού (% ξ.β.)^{23 25 26}

Διαλυτά σάκχαρα	Άμυλο	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη	Πηκτίνη	Τέφρα	Λίπη	Πρωτεΐνη
16.90	3.75	9.21	10.5	0.84	42.5	3.50	1.95	6.50
9.57	-	37.08	11.04	7.52	23.02	2.56	4.00	9.06
-	-	14.40	10.90	1.33	28.70	2.87	5.53	6.62

Πίνακας 7: Σύσταση φλοιού πορτοκαλιού (% ξ.β.)^{27 28}

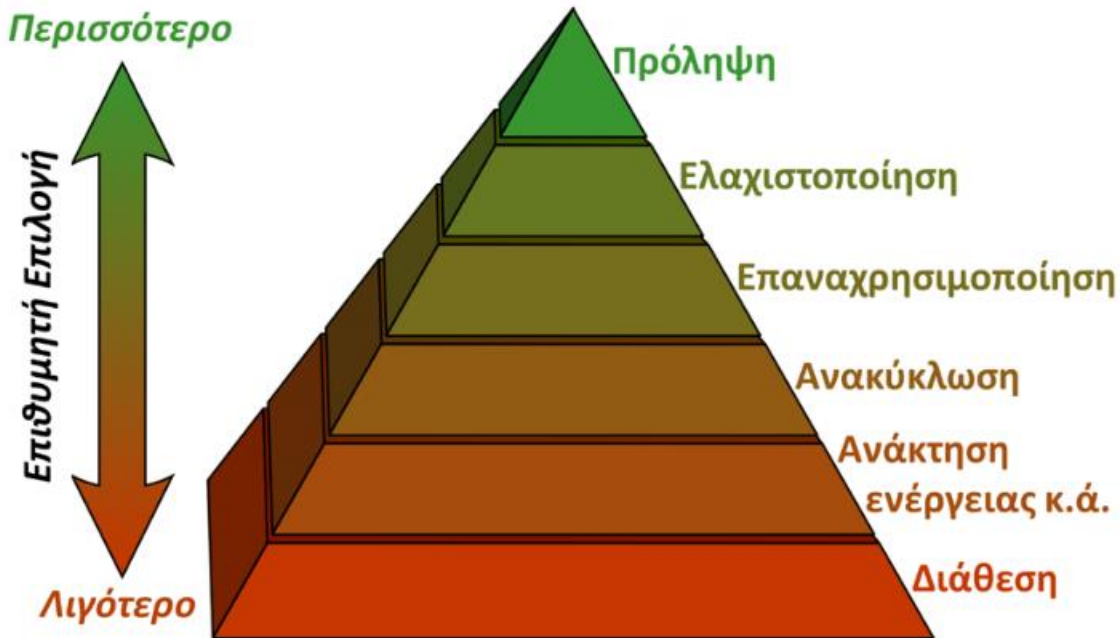
Crude Protein (CP)	NDF	ADF
7.9	42.6	34.7
5.8	20.0	12.9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΧΥΜΩΝ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΟΥ

3.1 Εισαγωγή

Η λήψη των αποφάσεων για την ορθή διαχείριση των αποβλήτων ακολουθεί την πυραμίδα ιεράρχησης της διαχείρισης αποβλήτων που αποτελείται από τέσσερα βασικά επίπεδα. Σημαντικός στόχος της διαχείρισης αποβλήτων θα πρέπει να είναι η μείωση της ποσότητας των απορριμμάτων μιας χρήσης και η διατήρηση του περιορισμένου χώρου υγειονομικής ταφής. Αυτός ο στόχος μπορεί να επιτευχθεί

επαναχρησιμοποιώντας και ανακυκλώνοντας όσα περισσότερα υλικά γίνεται. Σε πολλές περιπτώσεις χημικοί, βιολογικοί και ραδιενεργοί παράγοντες μπορούν να βοηθήσουν στην μείωση των απορριμμάτων που πρέπει να οδηγηθούν σε χώρους υγειονομικής ταφής. Γενικά, είναι απαραίτητο να προηγείται ένας σχεδιασμός που θα περιλαμβάνει τον εντοπισμό πιθανών ευκαιριών για την ελαχιστοποίηση των αποβλήτων και την ανάπτυξη κριτηρίων που θα πρέπει να πληρούν προκειμένου να οδηγηθούν σε επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση. Επομένως, στην πυραμίδα ιεράρχησης μπορεί να προστεθεί άλλο ένα επίπεδο που θα αναφέρεται στην πρόληψη της παραγωγής των αποβλήτων.²⁹



Εικόνα 2: Πυραμίδα ιεράρχησης διαχείρισης αποβλήτων.³⁰

Η πολιτική για την πρόληψη και τη διαχείριση των αποβλήτων ακολουθεί την εξής ιεράρχηση:

α) Πρόληψη και ελαχιστοποίηση

Για την πρόληψη της παραγωγής αποβλήτων λαμβάνονται μέτρα που προωθούν μοντέλα βιώσιμης παραγωγής και ενθαρρύνουν τον σχεδιασμό, την παραγωγή και την χρήση προϊόντων που χρησιμοποιούν αποτελεσματικά τους διαθέσιμους πόρους, έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν. Ακόμη, προωθείται η επισκευή και η επαναχρησιμοποίηση προϊόντων όπως οι ηλεκτρικές συσκευές, τα προϊόντα κλωστοϋφαντουργίας, τα έπιπλα, τις συσκευασίες και τα υλικά δομικών κατασκευών. Σημαντική είναι η μείωση των αποβλήτων που δημιουργούνται κατά την πρωτογενή παραγωγή, την επεξεργασία και την μεταποίηση, το λιανικό εμπόριο και την διανομή τροφίμων. Επίσης, ενθαρρύνεται η δωρεά και η αναδιανομή τροφίμων προς ανθρώπινη κατανάλωση. Τέλος, προωθείται η μείωση της περιεκτικότητας των υλικών σε επικίνδυνες ουσίες.³¹

β) Προετομασία για επαναχρησιμοποίηση

Η επαναχρησιμοποίηση αναφέρεται σε υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ξανά στην αρχική τους μορφή. Για να διασφαλισθεί η επαναχρησιμοποίηση των προϊόντων είναι απαραίτητη η δημιουργία

υποδομών συλλογής, προετοιμασίας και επισκευής για να γίνει η ορθή διαχείρισή τους και η επαναδιάθεσή τους στο κοινό. Επιπλέον, θα πρέπει να έχουν καθοριστεί πριν την παραγωγή των αποβλήτων κατευθυντήριες γραμμές ως προς τη διαχείριση των αποβλήτων, την διάσωση των προϊόντων και την βιώσιμη μετατροπή τους στην αρχική τους μορφή.²⁹

γ) Ανακύκλωση

Η ανακύκλωση είναι η διαδικασία συλλογής και επεξεργασίας υλικών που διαφορετικά θα απορρίπτονταν ως απόβλητα, και η μετατροπή τους σε νέα προϊόντα. Οι δήμοι θα πρέπει να αξιολογούν το πρόγραμμα ανακύκλωσης για τα καθημερινά απόβλητα ώστε να διασφαλίζεται ότι μπορεί να διαχειριστεί τα απόβλητα που παράγονται. Για να μεγιστοποιηθούν οι ευκαιρίες ανακύκλωσης για τα διάφορα ρεύματα αποβλήτων πρέπει να υπάρχει μια βιώσιμη εγκατάσταση ανακύκλωσης και τελικές αγορές για ανακυκλωμένα προϊόντα. Απαραίτητη είναι η ενημέρωση των πολιτών για τα προγράμματα ανακύκλωσης που ακολουθούν οι πόλεις και για την ασφάλεια των ανακυκλωμένων προϊόντων, ώστε να διασφαλίζεται η αποδοχή από το κοινό.

δ) Ανάκτηση

Όταν δεν είναι δυνατή η ανακύκλωση τότε επιλέγεται ο δρόμος της ανάκτησης που αφορά κυρίως την ανάκτηση ενέργειας αλλά και υλικών όπως είναι τα μέταλλα και ανόργανα υλικά. Περιλαμβάνει την αναερόβια χώνευση, την αποτέφρωση και την πυρόλυση που παράγουν ενέργεια.³²

ε) Διάθεση

Η διάθεση των αποβλήτων σε χώρους υγειονομικής ταφής αποτελεί την λιγότερο επιθυμητή διαδικασία διαχείρισης των αποβλήτων.

Σύμφωνα με οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης απαιτείται η διαχείριση των αποβλήτων:

- χωρίς να τίθεται σε κίνδυνο η ανθρώπινη υγεία και να βλάπτεται το περιβάλλον
- χωρίς να κινδυνεύουν το νερό, ο αέρας, το έδαφος, τα φυτά και τα ζώα
- χωρίς να προκαλούνται προβλήματα λόγω θορύβων και οσμών και
- χωρίς να επιβαρύνεται η ύπαιθρος

Επίσης, γίνεται λόγος για την μετατροπή των αποβλήτων σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας, ενώ διευκρινίζεται ότι ο παραγωγός των αποβλήτων έχει διευρυμένη ευθύνη και ότι «ο ρυπαίνων πληρώνει».³³

Παρά την ισχύουσα νομοθεσία, η παραγωγή αστικών αποβλήτων έχει αυξηθεί την τελευταία δεκαετία. Τα χαμηλά ποσοστά ανακύκλωσης, καθώς και η χαμηλότερη ποιότητα των ανακυκλώσιμων υλικών, οφείλονται εν μέρει στα αναποτελεσματικά συστήματα συλλογής αποβλήτων. Για ορισμένα ειδικά ρεύματα, όπως τα απόβλητα πετρελαίου και τα υφάσματα, τα στοιχεία έδειξαν ότι η αρχή "ο ρυπαίνων πληρώνει" δεν εφαρμόζεται πλήρως και ότι ορισμένα απόβλητα μπορεί να διατίθενται παράνομα, οδηγώντας σε ρύπανση.

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή επεξεργάζεται επί του παρόντος μια στοχευμένη αναθεώρηση της οδηγίας-πλαισίου για τα απόβλητα και έχει πραγματοποιήσει μια προκαταρκτική ανάλυση στο πλαίσιο της εκτίμησης των επιπτώσεων. Με γνώμονα τις συνεχιζόμενες προσπάθειες σε ολόκληρη την ΕΕ για την εφαρμογή ήδη υπαρχόντων και νέων πρωτοβουλιών της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (όπως η αναθεώρηση

της οδηγίας για τις συσκευασίες και τα απόβλητα συσκευασίας, του κανονισμού για τις μπαταρίες, της οδηγίας για τις βιομηχανικές εκπομπές, του κανονισμού για τον οικολογικό σχεδιασμό βιώσιμων προϊόντων), η Ευρωπαϊκή Επιτροπή καθόρισε το πεδίο εφαρμογής της πολιτικής πρωτοβουλίας για τη στοχευμένη τροποποίηση της ευρωπαϊκής οδηγίας για την διαχείριση των αποβλήτων (Waste Framework Directive) το 2023. Η πρωτοβουλία επικεντρώνεται σε μια στρατηγική για την επίτευξη μιας βιώσιμης διαχείρισης των κλωστοϋφαντουργικών αποβλήτων, ενόψει των στόχων που καθορίζονται από την ΕΕ για κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα. Η πρωτοβουλία θα αξιολογήσει επίσης τη σκοπιμότητα του καθορισμού στόχων μείωσης των αποβλήτων τροφίμων για τον περιορισμό των επιπτώσεων της αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων στο περιβάλλον και το κλίμα.

Επιπλέον, στόχος είναι η προώθηση των βέλτιστων πρακτικών που εντοπίστηκαν στις μελέτες υποστήριξης, όσον αφορά την παρακολούθηση της πρόληψης της δημιουργίας αποβλήτων, τη χωριστή συλλογή ξηρών ανακυκλώσιμων υλικών και βιοαποβλήτων και τη βιώσιμη διαχείριση των χρησιμοποιημένων ελαίων.³³

Η ευρωπαϊκή οδηγία καλεί τις χώρες της ΕΕ να λαμβάνουν τα αναγκαία μέτρα έτσι ώστε να επιτευχθούν οι παρακάτω στόχοι:

- έως το 2025 το ποσοστό των οικιακών αποβλήτων που θα οδηγούνται για επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση θα πρέπει να αυξηθεί στο 55%
- έως το 2020 το ποσοστό των αποβλήτων οικοδομών και κατασκευών θα πρέπει να αυξηθεί στο 70%
- αυστηροποίηση των μεθόδων ποσοτικοποίησης της προόδου της ανακύκλωσης³⁴

3.2 Εναλλακτικές αξιοποίησης αποβλήτων βιομηχανίας επεξεργασίας πορτοκαλιών

3.2.1 Διάθεση σε ΧΥΤΑ

Η κυρίαρχη μέθοδος για την διαχείριση των αποβλήτων του πορτοκαλιού είναι η διάθεσή τους σε χώρους υγειονομικής ταφής απορριμμάτων (ΧΥΤΑ). Γενικά, κατά την ταφή των αποβλήτων εκπέμπονται μεθάνιο και CO₂ (βιοαέριο) που αποτελούν αέρια του θερμοκηπίου. Παράλληλα, παράγονται στραγγίσματα που φέρουν επικίνδυνες ουσίες (πχ. βαρέα μέταλλα, τοξικές οργανικές ενώσεις, άζωτο) και μπορούν να μολύνουν τα υπόγεια ύδατα. Ακόμη, οι πυρκαγιές που εκδηλώνονται στους ΧΥΤΑ εκπέμπουν τοξικά αέρια, όπως διοξίνες, CO, H₂S, CH₄, που θέτουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία και βλάπτουν το περιβάλλον. Τα βασικά αυτά προβλήματα σε συνδυασμό με το κόστος για την διάθεση των αποβλήτων στους ΧΥΤΑ αποτελούν μειονεκτήματα για την χρήση αυτής της μεθόδου διαχείρισης αποβλήτων.³⁵ Γι' αυτό, σύμφωνα με οδηγίες της ΕΕ, η χρήση τους αποθαρρύνεται και πρέπει να ελαχιστοποιηθεί, ενώ υποστηρίζεται η αξιοποίηση των αποβλήτων με στόχο την ανάκτηση ενέργειας και πόρων, ακολουθώντας έναν βιώσιμο δρόμο.³⁶

3.2.2 Πηκτίνη

Η πηκτίνη είναι δομικός ετεροπολυσακχαρίτης που λειτουργεί ως πηκτικός παράγοντας και χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων σε γλυκά, μαρμελάδες, χυμούς φρούτων και σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Περίπου το 85% της πηκτίνης που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων, προέρχεται από υπολείμματα εσπεριδοειδών.³⁷

Για την ανάκτηση της πηκτίνης από τις φλούδες πορτοκαλιού ακολουθείται η διαδικασία της εκχύλισης. Αρχικά, οι φλούδες πορτοκαλιών οδηγούνται σε ξήρανση και έπειτα υποβάλλονται σε όξινη υδρόλυση. Το υδρόλυμα που προκύπτει διαχωρίζεται, συμπυκνώνεται με βρασμό υπό κενό και εκχυλίζεται με αιθανόλη. Το gel που σχηματίζεται μετά την αποθήκευση για 24 ώρες σε χαμηλή θερμοκρασία

διαχωρίζεται με διήθηση και ξηραίνεται στους 70°C. Υπό βέλτιστες συνθήκες, η απόδοση πηκτίνης 13.24%. Άλλη μια μέθοδος για την ανάκτηση της πηκτίνης είναι η χρήση της πολυγαλακτουρονάσης που παράγεται με εμβολιασμό του ορού γάλακτος με τη μαγιά *Kluyveromyces fragilis*.³⁸

3.2.3 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια είναι αρωματικά υγρά που περιέχουν πτητικές ενώσεις που βρίσκονται στους φλοιούς των εσπεριδοειδών και κατά 90% αποτελούνται από D – λιμονένιο, το οποίο είναι κυκλικό τερπένιο.³⁸ Τα αιθέρια έλαια που προκύπτουν μετά από εκχύλιση ως πρόσθετα τροφίμων (πχ. ενισχυτικά γεύσης), σε καλλυντικά ή σε αρώματα. Η απόδοση παραγωγής των αιθέριων ελαίων εξαρτάται από τη μέθοδο εκχύλισής τους που επιλέγεται κάθε φορά.³⁷ Οι αποδόσεις κυμαίνονται από 0.5 έως 3.0 kg ελαίου/τόνο καρπού.³⁹

3.2.4 Λιπάσματα

Χρησιμοποιώντας την διαδικασία της κομποστοποίησης οι φλούδες των πορτοκαλιών μπορούν να μετατραπούν σε λίπασμα. Ρυθμίζοντας την αναλογία C/N, το pH και την περιεκτικότητα σε υγρασία στις τιμές 24:3, 6,3 και 60%, αντίστοιχα, και δημιουργώντας τις κατάλληλες στρώσεις, με τακτικό γύρισμα και πότισμα, η κομποστοποίηση μπορεί να ολοκληρωθεί εντός 3 μηνών. Κατά την ανάλυση του έτοιμου κομποστ εντοπίζονται χαμηλά επίπεδα φυτοτοξικότητας που όμως είναι αποδεκτά. Επίσης, εμφανίζει αγωγιμότητα που μπορεί να επιφέρει αλκαλικότητα, αλλά τα χαρακτηριστικά όπως το πορώδες, η ικανότητα συγκράτησης του νερού και η πυκνότητά του, βρίσκονται εντός των επιτρεπτών ορίων για την ανάπτυξη των φυτών.

Πειράματα σε καλλιέργειες εσπεριδοειδών, έδειξαν ότι η ανάμιξη του κομποστ με το χώμα σε μια αναλογία 2, 4 και kg/m² βελτίωσε την ανάπτυξη των δέντρων κατά 25%, σε σχέση με τα δέντρα που καλλιεργήθηκαν σε μη εμπλουτισμένο χώμα. Άλλη μελέτη που αφορούσε την ανάπτυξη των μαρουλιών έδειξε ότι αναμειγνύοντας το χώμα με αφυδατωμένες ή νωπές φλούδες πορτοκαλιών για την αύξηση της περιεκτικότητας σε άζωτο, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση παραγωγής από 30 έως 130%.³⁸

3.2.5 Αιθανόλη

Η αιθανόλη χρησιμοποιείται ευρέως ως διαλύτης, αρωματική ουσία, φάρμακο και καύσιμο. Η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για καύσιμα προερχόμενα από ανανεώσιμους πόρους οφείλεται στις αλλαγές στην τιμή του πετρελαίου και του τεράστιου περιβαλλοντικού αποτυπώματος που αφήνει η εξόρυξή του. Έτσι, η παραγωγή βιοαιθανόλης από κυτταρίνη, που υπάρχει άφθονη, σε χαμηλό κόστος και χωρίς να έχει αρνητικές συνέπειες για το περιβάλλον, αποτελεί μια εξαιρετική εναλλακτική.

Έχει αποδειχθεί ότι η παραγωγή αιθανόλης από φλούδες πορτοκαλιών με την μέθοδο της ενζυμικής υδρόλυσης και στη συνέχεια με ζύμωση χρησιμοποιώντας ως μικροοργανισμό τον *S. cerevisiae*, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική. Επειδή, η φλούδα του πορτοκαλιού είναι πλούσια σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως τα οργανικά οξέα και τα αιθέρια έλαια, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί το όριο του D – λιμονενίου που δεν εμποδίζει την παραγωγή αιθανόλης. Επιπλέον, είναι απαραίτητο ουδέτερο pH προκειμένου τα οργανικά οξέα να είναι λιγότερο τοξικά για τα κύτταρα των μικροβίων.³⁸

3.2.6 Μεθάνιο

Το μεθάνιο αποτελεί το κύριο συστατικό του φυσικού αερίου και παράγεται αναερόβια από μεθανογόνα βακτήρια. Συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθείται για την παραγωγή μεθανίου από πολτό και φλούδες πορτοκαλιών είναι η θερμόφιλη αναερόβια χώνευση και στη συνέχεια η αερόβια επεξεργασία του χωνεμένου υγρού. Σε αναερόβιες καλλιέργειες, ο ρυθμός παραγωγής μεθανίου ήταν περίπου 0.49 m³/kg πτητικών στερεών (VS). Σε ημι-συνεχείς αναερόβιες καλλιέργειες, με φόρτωση 2.8kg VS/m³·d και υδραυλικούς χρόνους κατακράτησης 26 ημέρες, η απόδοση του μεθανίου ήταν 0.60 m³/kg VS.

Απαραίτητη ήταν η ρύθμιση του pH από ένα αρχικό 3.2 σε 8.0 με την προσθήκη CaCO₃. Κατά συνέπεια, η αερόβια επεξεργασία με ενεργό ιλύ μετέτρεψε τα πτητικά λιπαρά οξέα σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό, καθώς και την αμμωνία σε νιτρικά. Για την απομάκρυνση του αζώτου θα απαιτείται ένα πρόσθετο στάδιο απονιτροποίησης.

Επιπλέον, η παραγωγή μεθανίου μπορεί να βελτιωθεί με την προεπεξεργασία των φλοιών πορτοκαλιού με επιλεγμένα στελέχη *Sporotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium*. Οι μύκητες στην προεπεξεργασία ενίσχυσαν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, μείωσαν τις συγκεντρώσεις των αντιμικροβιακών συστατικών και επέτρεψαν τη χρήση υψηλότερου ποσοστού φόρτωσης των υποστρωμάτων.³⁸

3.2.7 Βιο-προσροφητικά

Η ρύπανση των υδάτων είναι ένα μείζον περιβαλλοντικό πρόβλημα που καλείται να αντιμετωπίσει η κοινωνία. Τα ιόντα βαρέων μετάλλων, όπως ο χαλκός, το κάδμιο, ο μόλυβδος, το νικέλιο, και το χρώμιο, που βρίσκονται συχνά στα βιομηχανικά λύματα, είναι τοξικά για την υδρόβια και τη χερσαία ζωή. Πολλές μέθοδοι, όπως η χημική καταβύθιση, η ιοντοανταλλαγή, οι διεργασίες με μεμβράνες και προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα, έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση ιόντων βαρέων μετάλλων από διάφορα υδατικά διαλύματα. Ωστόσο, η εφαρμογή αυτών των διεργασιών είναι κάποιες φορές τεχνικά δύσκολη και μη συμφέρουσα οικονομικά.

Τα βιο-προσροφητικά είναι ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων και τοξικών ουσιών. Οι φλούδες εσπεριδοειδών αποτελούν οικονομικές, φυσικές πηγές βιο-προσροφητικών υλικών. Ειδικότερα, εφαρμόζοντας κάποιες αντιδράσεις τροποποίησης και με αύξηση των ενεργών θέσεων προσρόφησης ενισχύεται η ικανότητα προσρόφησης τους, ώστε να είναι αποτελεσματικότεροι. Πιο συγκεκριμένα, με επιτυχία έχει δοκιμαστεί η χρήση φλοιών πορτοκαλιού και άμμου για τη διήθηση θαλασσινού νερού.^{37 40}

3.2.8 Υλικά συσκευασίας

Η χρήση των φλοιών των εσπεριδοειδών για τη δημιουργία βιοαποικοδομήσιμων συσκευασιών αποτελεί έναν νέο τομέα έρευνας. Οι υψηλές συγκεντρώσεις κυτταρίνης και ημικυτταρίνης σε συνδυασμό με τις χαμηλές συγκεντρώσεις λιγνίνης και τέφρας που περιέχονται στους φλοιούς τους καθιστούν ιδανικούς για την παραγωγή χαρτιού. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση τους φαίνεται να αύξησε την αντοχή στην έκθλιψη. Ακόμη, υπήρξαν και οικονομικά οφέλη, αφού το κόστος του χαρτοπολτού που περιείχε φλούδες πορτοκαλιού ήταν κατά 45% χαμηλότερο από αυτό του συμβατικού χαρτοπολτού.³⁸

3.2.9 Ζωοτροφή

Η σίτιση των ζώων με απόβλητα καλλιεργειών εσπεριδοειδών εφαρμόζεται, ήδη, εδώ και πολλά χρόνια. Η πρακτική αυτή έχει δύο πλεονεκτήματα: πρώτον μειώνεται οι εξάρτηση των μηρυκαστικών από την κατανάλωση δημητριακών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο και δεύτερον μειώνεται το κόστος της διαχείρισης των αποβλήτων καθώς αυτά προορίζονται για άμεση κατανάλωση.

Τα παραπροϊόντα που προκύπτουν από την επεξεργασία κυρίως των πορτοκαλιών και των γκρέιπφρουτ, που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χυμού, είναι οι φλοιοί, οι λευκές ινώδεις μεμβράνες, η μελάσα και τα κουκούτσια τους. Σε πολλές χώρες οι βιομηχανίες που επεξεργάζονται εσπεριδοειδή, διαθέτουν αυτά τα παραπροϊόντα για ζωοτροφή. Για φρέσκο χυμό πορτοκαλιού παράγονται 1.33 κιλά φλούδας ανά λίτρο χυμού, ενώ η αντίστοιχη τιμή για συμπυκνωμένο χυμό είναι πάνω από 2.85 κιλά ανά λίτρο.

Έχει παρατηρηθεί ότι τα βοοειδή τρώνε τα πεσμένα από τα δέντρα εσπεριδοειδή χωρίς να εμφανίζονται βλαβερές συνέπειες σε αυτά, ωστόσο θα ήταν προτιμητέο να κόβονται οι καρποί σε μικρότερα κομμάτια προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος απόφραξης του οισοφάγου των ζώων.

Μελέτη κατά την οποία φλούδες πορτοκαλιού χρησιμοποιήθηκαν ως τροφή για κοτόπουλα, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των λευκών κυττάρων, των λεμφοκυττάρων, της ανοσοσφαιρίνης G και της ανοσοσφαιρίνης M.³⁷

Οι απόψεις για το αν η βρώση εσπεριδοειδών από τα ζώα επηρεάζει τη γεύση του γάλακτος που παράγουν είναι αντικρουόμενες, ενώ μελέτες αναφέρουν ότι μπορεί να παρατηρηθεί και αυξημένη απόδοση παραγωγής γάλακτος. Γενικά, όταν τα ζώα τρέφονται με τους συγκεκριμένους καρπούς θα πρέπει να λαμβάνουν και συμπληρώματα πρωτεϊνών και ανόργανων συστατικών, καθώς τα εσπεριδοειδή είναι φτωχά σε αυτά.

Το πορτοκάλι αποτελείται κατά 45-60% από φλούδα και κουκούτσια, γι' αυτό είναι και γευστικές οι ζωοτροφές που προκύπτουν από αυτό για τα βοοειδή. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε νερό είναι ευπαθή κι έτσι πρέπει να καταναλώνονται άμεσα για να μην ξινίζουν, μυρίζουν και να μην παράγονται τοξίνες που είναι επιβλαβείς για τα ζώα. Οι μεγάλες ποσότητες που είναι διαθέσιμες κατά την περίοδο της συγκομιδής μπορούν να ενσιρωθούν και να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή όλο τον χρόνο. Το ενσίρωμα έχει ευχάριστη οσμή και γεύση και τρώγεται εύκολα από τα ζώα.^{39 38}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

4.1 Εισαγωγή

Καθώς αυξάνεται ο πληθυσμός της γης, αυξάνονται και οι απαιτήσεις σε κρέας και γάλα. Η ζήτηση για ζωοτροφές μηρυκαστικών οφείλεται κυρίως στην αύξηση της κατά κεφαλήν κατανάλωσης κρέατος σε όλο τον κόσμο και στην υιοθέτηση πρακτικών εντατικής εκτροφής. Προβλέπεται ότι η ζήτηση για ζωικές πρωτεΐνες θα αυξηθεί κατά 1.7% ετησίως, ενώ η παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων και κρέατος αναμένεται να αυξηθεί κατά 55% και 70% αντίστοιχα .

Η αγορά ζωοτροφών για μηρυκαστικά χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες: είδος ζώου (βοοειδή, γαλακτοπαραγωγά βοοειδή, άλλα), είδος συστατικού (δημητριακά, πρόσθετα ζωοτροφών, άλευρα, απόβλητα τροφίμων, άλλα) και γεωγραφία. Η αγορά ζωοτροφών μηρυκαστικών πρόκειται να παρουσιάσει σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης (CAGR) 3.2%. Η παγκόσμια βιομηχανία ζωοτροφών μηρυκαστικών αποτελείται από ορισμένους μεγάλους παραγωγούς ζωοτροφών που καλύπτουν ένα μεγάλο μέρος της αγοράς, ενώ μικρότερες επιχειρήσεις, κυρίως εργοστάσια παραγωγής ζωοτροφών, καλύπτουν το υπόλοιπο. Τα εργοστάσια παραγωγής ζωοτροφών κατέχουν περίπου το 94% του μεριδίου αγοράς, με τις πέντε μεγαλύτερες επιχειρήσεις (Archer Daniels Midland, De Heus, Land O Lakes Feed, Cargill Inc. και ForFarmers) να κατέχουν το υπόλοιπο 6%.⁴¹

Η αγορά ζωοτροφών για μηρυκαστικά καθορίζεται κυρίως από την αυξανόμενη ζήτηση ζωικών πρωτεϊνών υψηλής αξίας, την αυξανόμενη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σχετικά με την ασφάλεια του κρέατος και των γαλακτοκομικών προϊόντων και την αυξανόμενη εκτροφή ζώων. Η αυξανόμενη ζήτηση για τρόφιμα ζωικής προέλευσης έχει δημιουργήσει ευνοϊκές συνθήκες και ταυτόχρονα την πρόκληση για τους παραγωγούς να αυξήσουν την παραγωγή ζωοτροφών για μηρυκαστικά, να καταστήσουν την παραγωγή βιώσιμη και να ικανοποιήσουν την αυξανόμενη ζήτηση των παγκόσμιων τομέων γαλακτοκομικών προϊόντων και κρέατος σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι αγρότες εξαρτώνται από τις ζωοτροφές για τα ζώα τους ώστε να έχουν καλή απόδοση και να κερδίζουν βάρος σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η πρωταρχική πρόκληση για τους κτηνοτρόφους είναι να παράγουν υγιεινό κρέας υψηλής ποιότητας. Η αγορά ζωοτροφών για μηρυκαστικά διευρύνεται δεδομένης της καθιερωμένης πρακτικής

της επιτόπιας ανάμειξης των συστατικών των ζωοτροφών από τους μικρούς αγρότες και τους κτηνοτρόφους προκειμένου να παρέχουν στα μηρυκαστικά τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται στις σωστές ποσότητες.⁴¹

Οι σημαντικότεροι περιορισμοί κατά την παραγωγή ζωοτροφών είναι το αυξανόμενο κόστος των πρώτων υλών καθώς και οι νομοθετικοί περιορισμοί. Επιπλέον, οι καταναλωτές σε όλο τον κόσμο επιλέγουν προϊόντα ζωικής προέλευσης, όπως το κρέας, το γάλα και άλλα προϊόντα, που προέρχονται από ζώα βιολογικής εκτροφής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των πωλήσεων βιολογικών προϊόντων διατροφής, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων και των προϊόντων κρέατος, σε όλο τον κόσμο. Αυτή η αυξανόμενη ζήτηση για κρέας και γαλακτοκομικά προϊόντα βιολογικής προέλευσης μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη της αγοράς σύνθετων ζωοτροφών.

Παράλληλα, κατά την παραγωγή ζωοτροφών απαιτούνται τεράστιες καλλιεργήσιμες εκτάσεις, τεράστιες ποσότητες νερού και καυσίμων, γεγονός που την καθιστά μη βιώσιμη. Μια εφικτή προσέγγιση που θα μπορούσε να μειώσει το κόστος των ζωοτροφών διατηρώντας παράλληλα τη διατροφική αξία των ζωοτροφών είναι η αξιοποίηση των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων ως συστατικών ζωοτροφών. Με αυτόν τον τρόπο, η κτηνοτροφία θα μπορούσε να ανταποκριθεί στην αειφορία μέσω μιας προσέγγισης της κυκλικής οικονομίας, όπου τα υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως δευτερογενείς ζωοτροφές. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να αυξηθεί η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες και η πεπτικότητά τους, ώστε να καταστεί δυνατή η αξιοποίησή τους.^{22 42 43}

4.2 Χρήση παραπροϊόντων φρούτων ως ζωοτροφή

Τεράστιες ποσότητες αποβλήτων προκύπτουν τόσο κατά την καλλιέργεια όσο και κατά την επεξεργασία λαχανικών και φρούτων, που στη συνέχεια οδηγούνται σε κομποστοποίηση, χώρους υγειονομικής ταφής απορριμμάτων προκαλώντας ρύπανση του περιβάλλοντος. Το πλεονέκτημά τους είναι η θρεπτική τους αξία, η εύκολη διαθεσιμότητα και το σχετικά χαμηλό τους κόστος. Τα απόβλητα αυτά θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως ζωοτροφή ή να αναπτυχθούν από αυτά προϊόντα προστιθέμενης αξίας.³⁹

Για παράδειγμα, τα φρέσκα φύλλα της μπανανιάς μπορούν να καταναλωθούν από θηλαστικά απευθείας ή μετά από ενσίρωση με άχυρο, χωρίς να επηρεάζουν την παραγωγή του γάλακτος. Επιπλέον, οι φλούδες μπανάνας μπορούν να ενσωματωθούν σε επίπεδα 15 – 30% στην διατροφή των αγελάδων. Ο αποξηραμένος πολτός εσπεριδοειδών χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο δημητριακών και μπορεί να αντικαταστήσει το 20% στην διατροφή των βοοειδών και το 30% στην διατροφή των προβάτων, μη επηρεάζοντας την γέυση, τα θρεπτικά συστατικά και την απόδοση του γάλακτος. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι πυρήνες και οι φλούδες των μάνγκο και τα απόβλητα ανανά.³⁹

4.3 Χρήση παραπροϊόντων εσπεριδοειδών ως ζωοτροφή

Τα παραπροϊόντα εσπεριδοειδών χρησιμοποιούνται ως χαμηλού κόστους διατροφικό συμπλήρωμα στη διατροφή των βοοειδών και έχει υποστηριχθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη τόσο της *Escherichia coli* όσο και της *Salmonella* μέσα στα υγρά των στομάχων των μηρυκαστικών.^{44 45} Η ενσωμάτωση παραπροϊόντων εσπεριδοειδών στη διατροφή των βοοειδών έχει αναφερθεί ότι οδηγεί στη μείωση των τροφιογενών παθογόνων μικροοργανισμών λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους, δεδομένου ότι περιέχουν αιθέρια έλαια που διαθέτουν αντιμικροβιακές δραστηριότητες που μπορούν να βλάψουν το κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.⁴⁶ Από την άλλη πλευρά, τα παραπροϊόντα εσπεριδοειδών είναι επίσης κατάλληλα για συμπίληψη σε δίαιτες μηρυκαστικών, λόγω της ικανότητας των μηρυκαστικών να πραγματοποιούν την διαδικασία της πέψης ζωοτροφών υψηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες.

4.4 Ζωοτροφές και θρεπτικά συστατικά

Το μεγαλύτερο λειτουργικό κόστος σε μια κτηνοτροφική επιχείρηση είναι το κόστος των ζωοτροφών. Για να διατηρηθεί το κόστος αυτό χαμηλό, πρέπει να παρέχεται σωστή ποσότητα ζωοτροφής στα ζώα. Η υπερβολική σίτιση είναι σπατάλη, ενώ ο υποσιτισμός θα μειώσει την απόδοση των ζώων. Επομένως, η σωστή διατροφή των ζώων είναι καθοριστικής σημασίας για την κερδοφορία της κτηνοτροφικής επιχείρησης.

Οι εργαστηριακές αναλύσεις της σύνθεσης των ζωοτροφών χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της θρεπτικής τους αξίας. Μια τυπική ανάλυση ζωοτροφών περιλαμβάνει μετρήσεις ορισμένων σημαντικών ποιοτικών χαρακτηριστικών ή παραμέτρων (π.χ. ακατέργαστη πρωτεΐνη, ίνες, πεπτικότητα κ.λπ.) που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της θρεπτικής αξίας. Άλλες παράμετροι αναλύονται υπό ορισμένες ειδικές συνθήκες. Για παράδειγμα, η αδιάλυτη ακατέργαστη πρωτεΐνη με όξινο απορρυπαντικό (ADICP) μετριέται συνήθως μόνο εάν υποστεί θερμική βλάβη η τροφή.

Πολλές από τις παραμέτρους που περιλαμβάνονται στις εργαστηριακές εκθέσεις υπολογίζονται ή εκτιμώνται από τα μετρούμενα χαρακτηριστικά των ζωοτροφών. Για παράδειγμα, η ενέργεια πέψης, τα συνολικά θρεπτικά συστατικά και το δυναμικό πρόσληψης (intake potential) εκτιμώνται από τη συγκέντρωση των διαφόρων φυτικών ινών και της σχέσης μεταξύ τους.

Υπάρχουν κάποιοι βασικοί όροι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της διατροφικής αξίας των ζωοτροφών και αναφέρονται στις αναλύσεις που γίνονται σε δείγματα ζωοτροφών και στα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες που μετρούνται.⁴⁷

Ανάλυση ινών με απορρυπαντικά διαλύματα

Δεδομένου ότι οι ακατέργαστες ίνες (Crude fiber - CF) έχει βρεθεί ότι έχουν μη ικανοποιητική σχέση με την απόδοση των ζώων, έχει μικρή αξία στη διατροφή των μηρυκαστικών. Τα περισσότερα εργαστήρια χρησιμοποιούν το ευρέως αποδεκτό και διαδεδομένο πλέον σύστημα ανάλυσης ινών με απορρυπαντικό Van Soest για την ανάλυση των ζωοτροφών. Η τεχνική της χρήσης απορρυπαντικών διαλυμάτων για τον διαχωρισμό των εύπεπτων και των δύσπεπτων τμημάτων των φυτικών ιστών προτάθηκε αρχικά από τον Van Soest το 1963. Η ιδέα πίσω από την ανάλυση ινών με απορρυπαντικά είναι ότι οι ουσίες των φυτικών κυττάρων μπορούν να διαχωριστούν σε λιγότερο εύπεπτα κυτταρικά τοιχώματα (από ημικυτταρίνη, κυτταρίνη και λιγνίνη) και σε αρκετά εύπεπτα κυτταρικά περιεχόμενα (που περιέχουν άμυλο και σάκχαρα). Αυτά τα δύο συστατικά διαχωρίζονται επιτυχώς με τη χρήση δύο διαφορετικών συστημάτων απορρυπαντικών.

Σε μια ανάλυση με διαδοχικά στάδια, το δείγμα της ζωοτροφής βράζεται στο διάλυμα ουδέτερου απορρυπαντικού διαλύματος για να διαχωριστεί το διαλυτό κλάσμα ουδέτερου απορρυπαντικού (κυτταρικό περιεχόμενο) από το αδιάλυτο κλάσμα ουδέτερου απορρυπαντικού (κυτταρικά τοιχώματα). Περίπου το 98% των κυτταρικών περιεχομένων (σάκχαρα, άμυλο, διαλυτοί υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες, πηκτίνες, μέταλλα και βιταμίνες) είναι εύπεπτα. Η υπόλοιπη ξηρά ουσία αποτελεί τις ουδέτερες απορρυπαντικές ίνες (NDF). Στη συνέχεια, το NDF βράζεται στο όξινο απορρυπαντικό διάλυμα. Έτσι, διαλύεται η ημικυτταρίνη, ενώ η λιγνίνη και η κυτταρίνη παραμένουν αδιάλυτες. Το υπόλειμμα που παραμένει μετά τον βρασμό του NDF σε όξινο διάλυμα απορρυπαντικού ονομάζεται ίνες όξινου απορρυπαντικού (ADF). Η κυτταρίνη στη συνέχεια διαλύεται με την προσθήκη θειικού οξέος. Μόνο η λιγνίνη και η αδιάλυτη στο οξύ τέφρα παραμένουν μετά από αυτό το στάδιο. Το υπόλειμμα καίγεται στη συνέχεια σε κλίβανο και η διαφορά των βαρών πριν και μετά την αποτέφρωση δίνει την ποσότητα της λιγνίνης που υπήρχε στο δείγμα.

Γενικά, ισχύει:

- NDF = Ημικυτταρίνη + Κυτταρίνη + Λιγνίνη + Τέφρα
- ADF = Κυτταρίνη + Λιγνίνη + Τέφρα

Η ημικυτταρίνη, η κυτταρίνη και η λιγνίνη είναι δύσπεπτες στα μηρυκαστικά, ενώ η ημικυτταρίνη και η κυτταρίνη χωνεύονται μερικώς στα μηρυκαστικά. Το NDF είναι ένας καλός δείκτης του κύριου όγκου των ινών και έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της ποσότητας της τροφής που πρέπει να καταναλώσει κάποιο ζώο. Αντίθετα, το ADF είναι ένας καλός δείκτης της πεπτικότητας (με αρνητική συσχέτιση) και συνεπώς της ενεργειακής πρόσληψης.⁴⁷

➤ Neutral Detergent Fiber (NDF)

Το NDF είναι το υπόλειμμα ή το αδιάλυτο κλάσμα που απομένει μετά το βρασμό ενός δείγματος ζωοτροφής σε διάλυμα ουδέτερου απορρυπαντικού. Το NDF περιέχει συστατικά του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος εκτός από ορισμένες πηκτίνες. Το NDF θεωρείται μια στενή εκτίμηση των συνολικών ινών των ζωοτροφών, δεδομένου ότι περιλαμβάνει κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη, πυρίτιο, ταννίνες και κουτίνες. Η ημικυτταρίνη, η κυτταρίνη και η λιγνίνη αντιπροσωπεύουν τον κύριο ινώδη όγκο της ζωοτροφής. Επειδή δίνουν στο φυτό ακαμψία και του επιτρέπουν να στηρίζεται καθώς αναπτύσσεται, τα τρία αυτά συστατικά ταξινομούνται ως δομικοί υδατάνθρακες. Αν και η λιγνίνη είναι δύσπεπτη, η ημικυτταρίνη και η κυτταρίνη μπορούν να χωνευτούν από μικροοργανισμούς που διαθέτουν τα μηρυκαστικά ζώα (π.χ. βοοειδή, κασίκες ή πρόβατα) ή τα μονογαστρικά (π.χ. άλογα, κουνέλια, ινδικά χοιρίδια) ως μέρος του πεπτικού τους συστήματος.⁴⁷

➤ Acid Detergent Fiber (ADF)

Αυτό το ινώδες συστατικό αντιπροσωπεύει το λιγότερο εύπεπτο τμήμα ινών της ζωοτροφής. Αυτό το ιδιαίτερα δύσπεπτο τμήμα της χορτονομής περιλαμβάνει τη λιγνίνη, την κυτταρίνη, πυρίτιο και αδιάλυτες μορφές αζώτου. Οι ζωοτροφές με υψηλότερο ADF είναι λιγότερο εύπεπτες από τις ζωοτροφές με χαμηλότερο ADF, άρα καθώς αυξάνεται το επίπεδο ADF, τα επίπεδα ενέργειας πέψης (digestible energy) μειώνονται. Κατά την εργαστηριακή ανάλυση, το ADF είναι το υπόλειμμα που απομένει μετά το βράσιμο ενός δείγματος ζωοτροφής σε όξινο απορρυπαντικό διάλυμα (ADS). Το ADF χρησιμοποιείται συχνά για τον υπολογισμό της πεπτικότητας και των ολικών εύπεπτων θρεπτικών συστατικών (TDN).⁴⁷

➤ Acid Detergent Insoluble Crude Protein (ADICP)

Η ADICP είναι το αδιάλυτο κλάσμα πρωτεΐνης που παραμένει στο υπόλειμμα μετά τη διεργασία ενός δείγματος ζωοτροφής με όξινο απορρυπαντικό διάλυμα. Η ADICP αντιπροσωπεύει το τμήμα της πρωτεΐνης που δεν αποικοδομείται και συνεπώς δεν είναι διαθέσιμο στο ζώο. Επίσης, περιέχει οποιαδήποτε θερμικά κατεστραμμένη πρωτεΐνη που μπορεί να προκύψει από θέρμανση κατά την αποθήκευση ή την επεξεργασία. Στην περίπτωση αυτή, ένα τμήμα της πρωτεΐνης αντιδρά με τους υδατάνθρακες και σχηματίζει ένα δύσπεπτο σύμπλεγμα. Το κλάσμα αυτό εκφράζεται ως ποσοστό της ακατέργαστης πρωτεΐνης.⁴⁷

➤ Relative Feed Value (RFV)

Η σχετική αξία ζωοτροφών είναι ένας όρος ποιότητας ζωοτροφών που χρησιμοποιείται για την κατάταξη των ζωοτροφών σύμφωνα με την συνολική θρεπτική τους αξία. Η κατάταξη αυτή γίνεται σε σχέση με την τυπική θρεπτική αξία του σανού alfalfa. Ο πλήρως ανθισμένος σανός alfalfa, που περιέχει 41% ADF και 53% NDF σε ξηρή βάση, έχει RFV 100 και θεωρείται ότι παρέχει τη μέση τιμή RFV. Ο RFV συγκρίνει το δυναμικό δύο ή περισσότερων όμοιων ζωοτροφών με βάση την ενεργειακή πρόσληψη. Έτσι, ο δείκτης RFV αποτελεί δείκτη ποιότητας των ζωοτροφών για τη σύγκριση παρτίδων ζωοτροφών. Για παράδειγμα,

ζωοτροφές με RFV μεγαλύτερο από 100 είναι υψηλότερης ποιότητας από τον σανό alfalfa που βρίσκεται σε πλήρη άνθιση και οι ζωοτροφές με τιμή μικρότερη από 100 είναι χαμηλότερης ποιότητας.

Η RFV υπολογίζεται με βάση τις δύο εργαστηριακά προσδιοριζόμενες παραμέτρους: NDF και ADF.

$$RFV = DDM (\% \text{ του } DM) \times DMI (\% \text{ του } BW) \div 1.29$$

Όπου, DDM (εύπεπτη ξηρή βάση) και DMI (προσλαμβανόμενη ύλη σε ξηρή βάση) μπορούν να υπολογιστούν από τα ADF και NDF ως εξής:

$$DDM (\% \text{ της } DM) = 88.9 - 0.78 \times ADF (\% \text{ της } DM)$$

$$DMI (\% \text{ του } BW) = 120 \div NDF (\% \text{ του } DM)$$

Για την σύγκριση των ζωοτροφών προτιμάται ένα εύρος τιμών RFV ± 5 μονάδες από την τιμή που πρέπει να επιτευχθεί. Ένας από τους περιορισμούς του RFV είναι ότι προϋποθέτει σταθερές σχέσεις μεταξύ NDF και πρόσληψης (intake) και μεταξύ ADF και πεπτικότητας. Ωστόσο, δύο ζωοτροφές μπορεί να έχουν πανομοιότυπα επίπεδα NDF αλλά πολύ διαφορετικές πεπτικότητες και, ως εκ τούτου, προσλήψεις. Αυτό συχνά έχει ως αποτέλεσμα να υποεκτιμάται ο RFV των υψηλής ποιότητας ζωοτροφών, καθώς υποεκτιμάται η πρόσληψή τους.⁴⁷

➤ Relative Forage Quality (RFQ)

Ο δείκτης RFQ είναι ένας όρος ποιότητας ζωοτροφών που είναι παρόμοιος με την RFV σε ότι αφορά την κατάταξη των ζωοτροφών σύμφωνα με τη σχετική τους θρεπτική αξία. Ο RFQ έχει ίδιες ιδιότητες με τον RFV (π.χ. η βάση σύγκρισης είναι το 100, δεν έχει μονάδες, συγκρίνει το δυναμικό δύο ή περισσότερων ομοειδών ζωοτροφών με βάση την ενεργειακή πρόσληψη). Σε αντίθεση με την RFV, η RFQ λαμβάνει υπόψη την εύπεπτες ίνες.

Ο RFQ βασίζεται στην πρόσληψη και την πραγματική TDN αντί της DDM. Το RFQ λαμβάνει υπόψη το NDFD που αποτελεί το εύπεπτο κλάσμα του NDF και τη συμβολή άλλων θρεπτικών κλασμάτων κατά τον υπολογισμό του TDN, αντί του υπολογισμού του DDM με βάση μόνο το ADF. Το RFQ υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχέση:

$$RFQ = DMI (\% \text{ του } BW) \times (TDN (\% \text{ του } DM)) \div 1.23$$

Οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των DMI και TDN για τα όσπρια είναι ειδικές και είναι διαφορετικές από εκείνες που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των DMI και TDN για το γρασίδι. Συνεπώς, ο σωστός προσδιορισμός του τύπου της ζωοτροφής είναι απαραίτητος πριν από τον υπολογισμό του RFQ.⁴⁷

➤ Ακατέργαστη πρωτεΐνη (Crude Protein CP)

Η περιεκτικότητα σε ακατέργαστη πρωτεΐνη ενός δείγματος ζωοτροφής αντιπροσωπεύει το συνολικό άζωτο (N) στη διατροφή, το οποίο περιλαμβάνει όχι μόνο την πραγματική πρωτεΐνη αλλά και το μη πρωτεϊνικό άζωτο (π.χ. ουρία και αμμωνία σε μια ζωοτροφή). Επειδή το N αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του κάθε αμινοξέος, το μη πρωτεϊνικό άζωτο έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση πρωτεϊνών από τους μικροοργανισμούς του προστομάχου.

Σε εργαστηριακή ανάλυση, αρχικά προσδιορίζεται το ολικό N που υπάρχει σε ένα δείγμα και στη συνέχεια η συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας το συνολικό N με έναν συντελεστή. Ο συντελεστής αυτός είναι 6.25 για τις ζωοτροφές (φυτικές ζωοτροφές), επειδή τα φύλλα και τα στελέχη των φυτών περιέχουν 16% άζωτο, επομένως ένα μέρος αζώτου προς 6.25 μέρη πρωτεΐνης.

Για τους σπόρους, ο συντελεστής αυτός είναι διαφορετικός (π.χ. 5.70 για το σιτάρι και 5.90 για άλλα δημητριακά).

Αναμφίβολα, η CP είναι ένας σημαντικός δείκτης της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη μιας καλλιέργειας που προορίζεται για ζωοτροφή, όπως επίσης και της εκτίμησης της μη πρωτεϊνικής προέλευσης αζώτου. Έτσι, προσδιορίζεται η θρεπτική αξία της ζωοτροφής, ωστόσο, είναι λανθασμένη η αντίληψη ότι η πρωτεΐνη είναι πάντα το περιοριστικό θρεπτικό συστατικό στη διατροφή του ζώου. Στην πραγματικότητα, η ενεργειακή αξία των ζωοτροφών είναι το περιοριστικό χαρακτηριστικό για την κάλυψη των απαιτήσεων ενός ζώου σε ενέργεια. Η CP είναι απλώς μια εκτίμηση της περιεκτικότητας σε άζωτο ($N, \% \times 6,25 = CP, \%$). Για παράδειγμα, μια υψηλή συγκέντρωση νιτρικών θα έχει ως αποτέλεσμα υψηλό επίπεδο CP.⁴⁷

➤ Ακατέργαστες ίνες (Crude Fiber CF)

Η μέθοδος για τον διαχωρισμό των υδατανθράκων σε εύπεπτο και δύσπεπτο κλάσμα αποτελεί μια παλιά προσεγγιστική μέθοδο. Όταν η περιεκτικότητα σε CF είναι υψηλή, το ενεργειακό περιεχόμενο της ζωοτροφής είναι χαμηλή, επειδή οι ακατέργαστες ίνες θεωρούνται δύσπεπτες. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί διαδοχική εκχύλιση με οξύ και αλκάλια. Το εκχύλισμα των ακατέργαστων ινών χρησιμοποιούσαν κάποτε ως τυπική ανάλυση για τα ινώδη μέρη ή τα άπεπτα τμήματα των υδατανθράκων στις ζωοτροφές. Ορισμένες ουσίες πέπτονται μερικώς από μικροοργανισμούς στο στομάχι των μηρυκαστικών. Οι ακατέργαστες ίνες αποτελούνται στο μεγαλύτερο μέρος από κυτταρίνη, ένα μέρος λιγνίνη αλλά όχι τέφρα, οπότε υποεκτιμά τις πραγματικές ίνες και είναι μικρότερη από το κλάσμα ADF. Συνεπώς, η CF δεν είναι καλός δείκτης της πεπτικότητας στα μηρυκαστικά ζώα, και η χρήση αυτής της παραμέτρου στις ζωοτροφές για μηρυκαστικά μειώνεται.

Παρόλο που η CF δεν είναι μια πολύ χρήσιμη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση των ινών των ζωοτροφών, όπου η περιεκτικότητα σε λιγνίνη είναι σημαντική, η CF είναι μια λογική εκτίμηση της περιεκτικότητας σε ίνες στα σιτηρά λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς τους σε λιγνίνη. Συνεπώς, εξακολουθεί να χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση ζωοτροφών για μη μηρυκαστικά ή μονογαστρικά ζώα.⁴⁷

➤ Λίπη

Τα λίπη είναι τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων και αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας για τα ζώα, αφού περιέχουν 2.25 έως 2.8 φορές περισσότερη ενέργεια από τους υδατάνθρακες και είναι εξαιρετικά εύπεπτα. Το λίπος προστίθεται στα σιτηρέσια για την ενίσχυση των ενεργειακών επιπέδων άρρωστων ζώων ή της γεύσης της τροφής. Τα λίπη σε δείγματα ζωοτροφών προσδιορίζονται συνήθως μέσω εκχύλισης με αιθέρα. Εκτός από το λίπος, η εκχύλιση με αιθέρα μπορεί να διαλυτοποιήσει και ορισμένες άλλες ενώσεις, όπως οι φυτικές χρωστικές ουσίες, εστέρες και αλδεΐδες, γι' αυτό ονομάζεται ακατέργαστο λίπος. Το πραγματικό λίπος μπορεί να μετρηθεί με τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα.⁴⁷

➤ Νιτρικά – NO₃

Οι συγκεντρώσεις των νιτρικών στις ζωοτροφές είναι χαμηλές. Οι υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών στη διατροφή του ζώου μπορούν να καταστούν τοξικές για το ζώο (π.χ. μειωμένη αύξηση του βάρους, αδυναμία αναπαραγωγής, και σε σοβαρές περιπτώσεις θάνατος). Ένας ποιοτικός έλεγχος που ονομάζεται "δοκιμή διφαινυλαμίνης" μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των ζωοτροφών για πιθανή βλάβη από νιτρικά. Η συγκέντρωση νιτρικών που θεωρείται τοξική ποικίλλει ανάλογα με την κατηγορία των ζώων. Επίσης, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η συγκέντρωση των νιτρικών στο νερό που καταναλώνουν τα ζώα.⁴⁷

➤ Μακρο – μέταλλα

Τα μακρο-μέταλλα, στο σώμα των ζώων σε σχετικά μεγαλύτερες ποσότητες από ό,τι τα ιχνοστοιχεία. Επομένως, απαιτούνται σε σχετικά μεγάλες ποσότητες, δηλαδή σε γραμμάρια (g) ανά κεφάλι, ανά ημέρα, για την σωστή λειτουργία του οργανισμού του ζώου. Τα μακρο-μέταλλα επιτελούν συγκεκριμένους ρόλους στο σώμα, για παράδειγμα, βοηθούν στην ανάπτυξη των ιστών του σώματος (π.χ. οστά) ή στη ρύθμιση των μεταβολικών δραστηριοτήτων. Τα μακρο-μέταλλα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και πρέπει να παρέχονται σε κατάλληλες ποσότητες και αναλογίες. Τα απαραίτητα μακρο-μέταλλα για τα ζώα είναι: το ασβέστιο (Ca), ο φώσφορος (P), το νάτριο (Na), το μαγνήσιο (Mg), το κάλιο (K), το θείο (S) και το χλώριο (Cl). Η συνολική περιεκτικότητα του οργανισμού σε ανόργανα άλατα είναι περίπου 4% του σωματικού βάρους. Το ασβέστιο αποτελεί περίπου το 1.75% του συνολικού σωματικού βάρους, ο φώσφορος αποτελεί περίπου το 1.10% και το μαγνήσιο αποτελεί περίπου 0,04% του συνολικού σωματικού βάρους.⁴⁷

➤ Ιχνοστοιχεία

Τα ιχνοστοιχεία, υπάρχουν στους ιστούς του σώματος των ζώων σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Είναι θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται σε μικρές ποσότητες, γενικά σε ποσότητες χιλιοστογραμμαρίων (mg) ή μικρογραμμαρίων (μg) ανά κεφάλι ανά ημέρα, αλλά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατροφή των ζώων. Υπάρχουν 10 ιχνοστοιχεία που αναγνωρίζονται στη διατροφή των ζώων: ο σίδηρος (Fe), το μαγγάνιο (Mn), ο χαλκός (Cu), ο ψευδάργυρος (Zn), το σελήνιο (Se), το κοβάλτιο (Co), το ιώδιο (I), το χρώμιο (Cr), το μολυβδαίνιο (Mo) και το νικέλιο (Ni). Ωστόσο, ο χαλκός είναι ιδιαίτερα τοξικός για τα πρόβατα και το σελήνιο μπορεί επίσης να είναι τοξικό.⁴⁷

➤ Αφλατοξίνες

Η ανάπτυξη μυκήτων ή μούχλας στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πολλών διαφορετικών τύπων τοξικών βιοχημικών ουσιών. Ως ομάδα, αυτές οι τοξικές ουσίες ονομάζονται συνήθως μυκητοτοξίνες. Ο όρος αφλατοξίνες αναφέρεται σε μια συγκεκριμένη ομάδα μυκητοτοξινών που παράγονται από ορισμένες μύκητες του γένους *Aspergillus*. Υπάρχουν τέσσερις κύριες αφλατοξίνες που ονομάζονται B1, B2, G1, G2 καθώς και δύο επιπλέον μεταβολικά προϊόντα γνωστά ως M1 και M2 που είναι άμεσες επιμολύνσεις τροφίμων και ζωοτροφών.

Η ανάπτυξη μυκήτων (ή μούχλας) και η μόλυνση με αφλατοξίνες προκαλείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των μυκήτων, του ξενιστή (τρόφιμα ή ζωοτροφές) και του περιβάλλοντος. Η παρουσία αφλατοξινών σε ζωοτροφές και τρόφιμα είναι σημαντικός παράγοντας υποβάθμισης της ποιότητας και συνδέεται με διάφορες ασθένειες στην κτηνοτροφία, τα κατοικίδια ζώα και τον άνθρωπο. Η αφλατοξίκωση είναι μια ηπατική νόσος. Η ηπατική βλάβη επιφέρει μειωμένη αναπαραγωγική απόδοση, μειωμένη γαλακτοπαραγωγή ή παραγωγή αυγών, εμβρυϊκό θάνατος, τερατογένεση, όγκους και καταστολή της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) αναφέρει ότι το σημείο δράσης των ολικών αφλατοξινών για τα ανθρώπινα τρόφιμα είναι 20 ppb, με εξαίρεση το γάλα, το οποίο έχει επίπεδο δράσης 0.5 ppb για την αφλατοξίνη M1.⁴⁷

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : Μονοκυτταρική πρωτεΐνη (Single cell protein – SCP)

Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από αμινοξέα, τα οποία δεν συντίθενται στον οργανισμό, γι' αυτό και η διατροφική αξία των πρωτεϊνών εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε αυτά.⁴⁸ Οι πρωτεΐνες αποτελούν βασικό συστατικό της διατροφής των ανθρώπων και των ζώων, καθώς είναι απαραίτητες για

τη δομή, τη λειτουργία, την ρύθμιση των κύριων ιστών και οργάνων του σώματος, την παραγωγή ενζύμων και αποτελούν βασικό συστατικό των ορμονών.^{49 50}

Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί απευθείας ως τροφή κυρίως από λαούς αναπτυσσόμενων χωρών, όπου ο υποσιτισμός είναι απειλητικό για την ζωή πρόβλημα. Στη λίμνη Τσαντ της Αφρικής, πριν από πολλά χρόνια, καλλιεργήθηκε η *Spirulina* που αποτελεί ένα είδος άλγους, προκειμένου να καλύψει τις ανάγκες των ντόπιων σε πρωτεΐνη. Ακόμη, οι Γερμανοί κατά την διάρκεια του Α΄ Παγκοσμίου Πολέμου χρησιμοποίησαν ένα είδος της *Candida* μέσα στα γεύματά τους, ακόμη και στις σούπες και τα λουκάνικά τους.⁵¹

Η ανεπάρκεια της παραγωγής των πρωτεϊνών λόγω της αυξημένης ζήτησης παγκοσμίως οδήγησε στην αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων παραγωγής πρωτεΐνης. Έτσι, η ανάπτυξη της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης ήρθε να αντικαταστήσει τις συμβατικές πηγές τροφίμων και ζωοτροφών και εξελίχθηκε σε διεργασία βιομετατροπής που μετατρέπει τα παραπροϊόντα χαμηλής αξίας, όπως είναι τα απόβλητα, σε προϊόντα με προστιθέμενη διατροφική και εμπορική αξία.⁴⁹

Η μονοκυτταρική πρωτεΐνη είναι ένα από τα υψηλής ποιότητας προϊόντα που λαμβάνονται από απόβλητα. Ως μονοκυτταρικές πρωτεΐνες θεωρούνται αφυδατωμένα κύτταρα που παράγονται μέσω της δράσης μικροβίων, μαγιάς, βακτηρίων και μυκήτων σε διαφορετικά υποστρώματα. Τα βακτήρια και οι μύκητες αποτελούν τους κύριους παραγωγούς, αφού εμφανίζουν ταχύτατο ρυθμό ανάπτυξης και μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Οι μονοκυτταρικές πρωτεΐνες μπορούν να αντικαταστήσουν τη χρήση των φυτικών πρωτεϊνών, οι οποίες απαιτούν μεγάλες ποσότητες νερού και μεγάλες εκτάσεις για την παραγωγή τους. Ακόμη, η παραγωγή τους είναι δυνατή καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου, καθώς δεν εξαρτάται από τις καιρικές συνθήκες.⁵²

Εκτός από πρωτεΐνες, η SCP περιέχει υδατάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, μέταλλα, βιταμίνες και σημαντικά αμινοξέα.⁵¹ Είναι ελλιπής σε αμινοξέα που περιέχουν θείο, όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη, ωστόσο υψηλά είναι τα επίπεδα της λυσίνης. Έτσι, η συμπλήρωση αυτών των δύο αμινοξέων απαιτείται για τη χρήση της SCP ως συστατικό ζωοτροφής. Τα βακτήρια και τα φύκια έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη B12 και βιταμίνη A, αντίστοιχα. Οι συνθετέστερες βιταμίνες που υπάρχουν στην SCP είναι η ριβοφλαβίνη, η θειαμίνη, η πυριδοξίνη, η νιασίνη η χολίνη, το φολικό οξύ, η βιοτίνη, η ινσιτόλη και η B12.^{52 53}

5.1 Χρήση SCP

- Στη διατροφή των ανθρώπων και των ζώων (σε πουλερικά, γουρούνια, πρόβατα και κατσίκια)
- Ως πρόσθετα τροφίμων για την αύξηση της θρεπτικής αξίας τους και ως εκκινητές καλλιεργειών (πχ. στην διαδικασία της ζύμωσης)
- Σε βιομηχανικές διεργασίες ως σταθεροποιητής του αφρού και κατά την επεξεργασία χαρτιού και δέρματος⁵¹

Οι μικροοργανισμοί μέσω της διαδικασίας της ζύμωσης χρησιμοποιούν τα υποστρώματα για να αυξήσουν την κυτταρική τους μάζα που αποτελείται από μονοκυτταρική πρωτεΐνη. Μετά την ζύμωση ακολουθεί η συλλογή της βιομάζας που έχει δημιουργηθεί, η οποία υποβάλλεται σε καθαρισμό, κυτταρική διάσπαση και στην συνέχεια εκχύλιση για να επιτευχθεί η υψηλότερη παραγωγή και η καλύτερη ποιότητα.⁵²

5.2 Βιομηχανική παραγωγή SCP

Η κύρια διαδικασία παραγωγής μονοκυτταρικής πρωτεΐνης είναι η ζύμωση. Τα επιλεγμένα στελέχη αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται σε κατάλληλα υποστρώματα με την διαδικασία της καλλιέργειας.

Submerged fermentation

Η ταχεία ή βυθισμένη ζύμωση είναι η διαδικασία κατά την οποία το υπόστρωμα χρησιμοποιείται σε υγρή μορφή που περιέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξή του. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε ζυμωτήρα που λειτουργεί με συνεχή τρόπο και η προκύπτουσα βιομάζα συλλέγεται με φυγοκέντρηση ή διήθηση και το τελικό προϊόν οδηγείται σε ξήρανση.⁵²

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία της αερόβιας ζύμωσης είναι η πηγή άνθρακα, η πηγή αζώτου, ο ρυθμός αερισμού, το διαλυμένο οξυγόνο, η περίοδος επώασης, η θερμοκρασία και το pH.

Ημιστερεά ζύμωση

Στη διαδικασία της ημιστερεάς ζύμωσης, η προετοιμασία του υποστρώματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα. Αυτός ο τύπος ζύμωσης απαιτεί υψηλή επένδυση κεφαλαίου και κόστος λειτουργίας, καθώς η καλλιέργεια γίνεται μέσω πολλών λειτουργιών, όπως ανάμιξη πολυφασικού συστήματος, ανάδευση, μεταφορά μορίων οξυγόνου από φυσαλίδες αερίου στους μικροοργανισμούς μέσω της υγρής φάσης και τελικά μεταφορά θερμότητας από την υγρή φάση στο περιβάλλον. Ένας συγκεκριμένος τύπος βιοαντιδραστήρα έχει σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό των φαινομένων μεταφοράς ενέργειας και μάζας που ονομάζεται ζυμωτήρας Uloop.⁵²

Στερεά ζύμωση

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης πραγματοποιείται με τη χρήση διαφόρων τύπων ζυμωτήρων, μιας ποικιλίας μικροοργανισμών και διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα προκύπτοντα προϊόντα μπορεί να είναι SCP, ένζυμα, ζωοτροφές, οργανικά οξέα, αιθανόλη, χρωστικές ουσίες, βιταμίνες του συμπλέγματος Β ή αρώματα. Η διαδικασία απαιτεί υπόστρωμα σε καθαρή στερεή μορφή όπως το σιτάρι, το πίτουρο σίτου ή πίτουρο ρυζιού.⁵²

5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή SCP

5.3.1 Κριτήρια επιλογής μικροοργανισμών

Οι ταχέως αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί προτιμώνται, καθώς διευκολύνουν την μαζική παραγωγή βιομάζας. Ο συντελεστής απόδοσης της βιομάζας είναι το συνολικό βάρος των παραγόμενων κυττάρων ανά μονάδα υποστρώματος που έχει καταναλωθεί. Όταν ο ρυθμός ανάπτυξης είναι αργός, τότε μεγαλύτερη ποσότητα υποστρώματος θα καταναλώνεται με αποτέλεσμα μικρότερη παραγωγή, επομένως επηρεάζεται αρνητικά ο συντελεστής απόδοσης. Οι μικροοργανισμοί όπως τα βακτήρια και η μαγιά έχουν πολύ σύντομο χρόνο πολλαπλασιασμού, καθώς διπλασιάζουν τον πληθυσμό τους σε μόλις 5-15 λεπτά. Ενώ, τα φύκια και τα είδη μούχλας διπλασιάζονται σε 2-4 ώρες.⁵²

Ακόμη, βασικό κριτήριο είναι η αντοχή των μικροοργανισμών στην θερμότητα. Τα κύτταρα διαφορετικών μικροβίων όταν υποστούν θερμικό σοκ αναπτύσσουν αντίσταση σε διαφορετικές καταπονήσεις. Η ανοχή στην καταπόνηση μπορεί να αναπτυχθεί με την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων, όπως η προσθήκη χημικών ουσιών και η εφαρμογή θερμότητας. Το ευρύτερο ανεκτό εύρος θερμοκρασιών για τους μικροοργανισμούς μειώνει την ανάγκη ελέγχου της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης.⁵²

Το pH του μέσου ανάπτυξης μεταβάλλεται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, γι' αυτό προστίθεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα για την διατήρησή του. Οι μύκητες απαιτούν χαμηλότερο pH από τα βακτήρια για την ανάπτυξή τους. Επομένως, η βακτηριακή ανάπτυξη μπορεί να ανασταλεί κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας διατηρώντας χαμηλό pH στο μέσο.

5.3.2 Υποστρώματα για την παραγωγή SCP

Ο βαθμός παραγωγής SCP εξαρτάται από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος. Είναι εξαιρετικά σημαντικό τα υποστρώματα να αποτελούν πλούσια πηγή άνθρακα. Οι υδατάνθρακες αποτελούνται κυρίως από άνθρακα, ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης. Η χρήση αυτών των υποστρωμάτων οφείλεται στην εξάρτηση των μικροβίων από τους μονοσακχαρίτες (πχ. γλυκόζη, φρουκτόζη) και τους δισακχαρίτες (πχ. σακχαρόζη, μαλτόζη) για τον πολλαπλασιασμό τους, οι οποίοι αποτελούν δομικά συστατικά των υδατανθράκων. Επιπλέον, οι υδατάνθρακες είναι εύκολα διαθέσιμοι και έχουν υψηλή ενεργειακή αξία.⁵²

Η παραγωγή SCP μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση εύκολα διαθέσιμων αποβλήτων τροφίμων, τα οποία προηγουμένως θεωρούνταν χαμηλής ή μηδενικής αξίας. Οι πυρήνες του μήλου, οι πολτοί εσπεριδοειδών, πατάτας, ανανά και παπάγιας και οι φλούδες πορτοκαλιών αποτελούν οικονομικά υποστρώματα, με θρεπτικά συστατικά, κατάλληλα για την ανάπτυξη των μονοκυτταρικών πρωτεϊνών.³⁷ Άλλα υποστρώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η μελάσα, ο ορός γάλακτος, το άμυλο, τα αλκάνια, το CO₂ και οι υδρογονάνθρακες.⁵¹

Λιγνοκυτταρινική βιομάζα, όπως απόβλητα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης έχουν χρησιμοποιηθεί ως κατάλληλο υπόστρωμα για την αύξηση της παραγωγής SCP. Οι συγκεκριμένες πρώτες ύλες υδρολύονται με φυσικές, χημικές και ενζυμικές μεθόδους πριν χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα. Ουσιαστικά, οι μέθοδοι προεπεξεργασίας κατέστησαν δυνατό το σπάσιμο του ανθεκτικού στρώματος της λιγνίνης μειώνοντας την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται έτσι τη διαθεσιμότητα των υδατανθράκων (άμορφη κυτταρίνη και ημικυτταρίνες) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους μικροοργανισμούς.⁵⁴

5.3.3 Ύπαρξη αζώτου

Λόγω των δομικών ιδιοτήτων, η πηγή αζώτου είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κατά τη σύνθεση της πρωτεΐνης από μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί απαιτούν άζωτο για τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή SCP. Διαφορετικές πηγές αζώτου όπως αμμωνία, άλατα αμμωνίου ή νιτρικά καταναλώνονται από τα μικρόβια λειτουργούν ως πηγή αζώτου.

Ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν κάποιες πρόσθετες απαιτήσεις ανάπτυξης και συντήρησης, όπως βιταμίνες και ανόργανα άλατα, οι οποίες θα πρέπει να πληρούνται κατάλληλα για να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση.^{52 54}

5.3.4 Αερισμός

Ο αερισμός είναι σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης. Επίσης, η μορφολογία των μικροοργανισμών παίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση του οξυγόνου. Έτσι, κάθε μικροοργανισμός απαιτεί διαφορετικό ρυθμό αερισμού.⁵⁴

5.3.5 Θερμοκρασία και pH

Η θερμοκρασία αποτελεί βασικό παράγοντα που επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και κατ'επέκταση την παραγωγή βιομάζας. Συνήθως, για την πραγματοποίηση της διαδικασίας της ζύμωσης επιλέγεται η θερμοκρασία δωματίου, δηλαδή περίπου από 25 έως 27 °C. Ωστόσο, κάποιοι μύκητες όπως οι *K. fragilis* και *C. utilis*, επωάζονται βέλτιστα σε θερμοκρασίες από 33 έως 35 °C. Για τα βακτήρια *Bacillus spp* και *E. coli*, ενδείκνυται περιβάλλον σε θερμοκρασία 30 °C, όπως επίσης και για την ανάπτυξη του *S. cerevisiae*.⁵⁴

Όσον αφορά στο pH, μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην πραγματοποίηση πειραμάτων σε pH που κυμαίνεται από 3.5 έως 7. Πιο συγκεκριμένα, πειράματα που έγιναν χρησιμοποιώντας τον *S. Cerevisiae*

και ως υπόστρωμα σταφύλια, το pH ρυθμίστηκε στο 5.8, ενώ όταν το υπόστρωμα ήταν η γλυκόζη το pH ήταν ίσο με 6.⁵⁴

5.3.6 Μικροοργανισμοί

Η δράση των βακτηρίων για τον πολλαπλασιασμό τους πραγματοποιείται πολύ γρήγορα, μέσα σε 20 έως 120 λεπτά, και αναπτύσσονται πλήθος πρώτων υλών και υποστρωμάτων, όπως το άμυλο και τα σάκχαρα. Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται εύκολα σε απόβλητα οργανικής ύλης και στο νερό όταν αυτό έχει εμπλουτιστεί με μέταλλα και θρεπτικά συστατικά που διευκολύνουν την ανάπτυξή τους.

Τα μικροφύκη που καλλιεργούνται για ανθρώπινη και ζωική κατανάλωση περιέχουν μέχρι και 70% πρωτεΐνη, ενώ είναι και εξαιρετικές πηγές ωμέγα 3 λιπαρών οξέων, ανόργανων αλάτων, βιταμινών και χλωροφύλλης.

Πολλά είδη μυκήτων χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μονοκυτταρικών πρωτεϊνών. Οι μύκητες περιέχουν από 30% έως 50% πρωτεΐνη όταν καλλιεργούνται για την παραγωγή SCP. Η πρωτεΐνη τους είναι πλούσια σε λυσίνη και θρεονίνη. Ακόμη, η πρωτεΐνη που προέρχεται από μύκητες είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, όπως διάφορες βιταμίνες κυρίως από το σύμπλεγμα βιταμινών Β (πχ. ριβοφλαβίνη, νιασίνη, θειαμίνη, βιοτίνη και φολικό οξύ).⁵²

5.4 Ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας από τους πιο γνωστούς ζυμομύκητες που χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία και σε άλλες βιομηχανίες. Αποτελεί ευκαρυωτικό οργανισμό που μπορεί να καλλιεργηθεί εύκολα και πραγματοποιεί την διαδικασία της ζύμωσης. Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων του *S. cerevisiae* είναι περίπου 90 λεπτά και μπορούν να αναπτυχθούν είτε αερόβια είτε αναερόβια. Ανάλογα με τον τρόπο που αναπτύσσονται, χρησιμοποιούν διαφορετικά σάκχαρα ως υποστρώματα. Κατά την αερόβια ζύμωση η γαλακτόζη και η φρουκτόζη είναι τα κατάλληλα σάκχαρα. Όλα τα στελέχη απαιτούν πηγές αζώτου και φωσφόρου για να αναπτυχθούν. Επίσης, χρήσιμα είναι το θείο και διάφορα μέταλλα όπως το μαγνήσιο. Γι' αυτό κατά την καλλιέργεια της μαγιάς είναι απαραίτητη η παρουσία ενώσεων, όπως τα $MgSO_4$, KH_2PO_4 , και $(NH_4)_2SO_4$.⁵⁵

Ο *S. cerevisiae* αποτελείται από ένα εξωτερικό παχύ κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο περιλαμβάνει ένα δίκτυο β-γλυκάνης και μια μικρή ποσότητα χιτίνης που συνδέεται με ένα στρώμα μαννοπρωτεΐνης. Αυτές οι ιδιότητες του κυτταρικού τοιχώματος καθιστούν τα κύτταρα της μαγιάς, φορείς παρατεταμένης απελευθέρωσης.

Μετά από πολλές δοκιμές σε διαφορετικές συνθήκες για την βελτιστοποίηση της διαδικασίας ανάπτυξης των κυττάρων της μαγιάς, σχεδιάστηκαν πολλές καμπύλες με στόχο την μοντελοποίηση της ανάπτυξης.

5.4.1 Παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP) από φλοιούς πορτοκαλιών και *Saccharomyces cerevisiae*

Η μαγιά (*S. cerevisiae*) ήταν ο πρώτος μικροοργανισμός του οποίου η σημασία ως συμπλήρωμα ζωοτροφών αναγνωρίστηκε πριν από σχεδόν έναν αιώνα. Η μαγιά θεωρείται κατάλληλη για μονοκυτταρική παραγωγή λόγω της ανώτερης θρεπτικής της ποιότητας, αφού η περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνες κυμαίνεται μεταξύ 45 – 55 %.⁵³ Ο συνδυασμός των δημητριακών με την μονοκυτταρική πρωτεΐνη και κυρίως τη μαγιά, τα καθιστά εξίσου καλά με τις ζωικές πρωτεΐνες.⁴⁹

Η χρήση των φλοιών πορτοκαλιού ως υπόστρωμα σε συνδυασμό με τον *S. Cerevisiae* αποτελεί μια από αυτές τις δοκιμές ζύμωσης που έχουν γίνει για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης και προορίζεται για ζωοτροφή. Μελέτες αναφέρουν ότι οι βέλτιστες συνθήκες για την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας είναι σε θερμοκρασία 37 °C και pH = 7 ⁴⁹, άλλες αναφέρουν ότι η ζύμωση σε περιβάλλον με pH = 5.5 και

Θερμοκρασία 28 °C είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή βιομάζας με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη 30.5%, ενώ άλλα πειράματα κάνουν λόγο για περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη 57% όταν το pH = 5.5 και η θερμοκρασία είναι ίση με 36 °C.⁵³

Κατά την πραγματοποίηση της ζύμωσης, απαραίτητη ήταν η παρουσία θρεπτικών συστατικών για τον μικροοργανισμό όπως τα MgSO₄, KH₂PO₄, FeSO₄, (NH₄)₂SO₄, FeCl₃ και Na₂SO₄.^{49 53}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : Παραγοντικός Σχεδιασμός

6.1 Εισαγωγή

Η ανάγκη για την ταυτόχρονη μεταβολή όλων των μεταβλητών ενός συστήματος, σε αντίθεση με την καθιερωμένη αρχή της μεταβολής μίας μόνο μεταβλητής κάθε φορά ενώ διατηρούνται σταθερές οι υπόλοιπες, οδήγησε στον στατιστικό σχεδιασμό πειραμάτων. Ουσιαστικά, προτείνεται η οργάνωση από τον ερευνητή μικρών σειρών διαδοχικών πειραμάτων, σε κάθε μία από τις οποίες μεταβάλλονται συγχρόνως όλες οι μεταβλητές σύμφωνα με ορισμένους κανόνες. Οι σειρές είναι κατάλληλα οργανωμένες ώστε να είναι δυνατόν, μετά από μαθηματική επεξεργασία, να επιλεγούν οι συνθήκες για τον σχεδιασμό μια επόμενης σειράς.

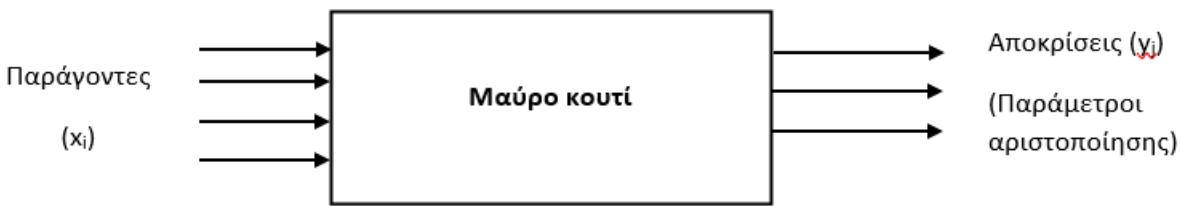
Τα πλεονεκτήματα του στατιστικού σχεδιασμού είναι ότι:

- α) Παρέχει περισσότερες πληροφορίες ανά πείραμα
- β) Εξασφαλίζει οργανωμένη συλλογή και ανάλυση πληροφοριών
- γ) Κάνει εκτίμηση της αξιοπιστίας των πληροφοριών από άποψη πειραματικών και αναλυτικών διακυμάνσεων
- δ) Δίνει τη δυνατότητα ποσοτική εκτίμησης των αλληλεπιδράσεων
- ε) Οδηγεί στον εντοπισμό του αρίστου

Όσον αφορά στο πρώτο πλεονέκτημα η υπεροχή του στατιστικού σχεδιασμού σε σχέση με την μέθοδο μεταβολής μιας μόνο μεταβλητής είναι σαφής. Στην πρώτη περίπτωση ο αριθμός των πειραμάτων ενός παραγοντικού σχεδιασμού σε δύο επίπεδα είναι 2^k , όπου k ο αριθμός των παραγόντων, ενώ στην δεύτερη περίπτωση ο αριθμός των πειραμάτων είναι 4^k . Επομένως, είναι φανερό ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των παραγόντων ο αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων μεταβάλλοντας μόνο μια μεταβλητή αυξάνεται δραματικά.

6.1.1 Βασικές έννοιες για τον σχεδιασμό πειραμάτων

Σχεδιασμός ενός στατιστικού πειράματος, είναι η μέθοδος επιλογής του αριθμού των μετρήσεων (επί μέρους πειραμάτων) και των συνθηκών εκτέλεσης τους που είναι αναγκαία και ικανά για τη λύση του προβλήματος που έχει τεθεί με την απαιτούμενη ακρίβεια. Το αντικείμενο της έρευνας απαιτεί ακριβή προσδιορισμό και γι' αυτό έχει υιοθετηθεί η αρχή του "μαύρου κουτιού" της Κυβερνητικής. Ένας πειραματιστής προκειμένου να χρησιμοποιήσει μεθόδους σχεδιασμού πειραμάτων πρέπει να μπορεί να διαμορφώσει το πρόβλημα του σύμφωνα με αυτή την αρχή.



Εικόνα 3: Διάγραμμα μαύρου κουτιού κυβερνητικής.

Οι είσοδοι του μαύρου κουτιού ονομάζονται παράγοντες (x_i), ενώ οι έξοδοί του αποτελούν τα χαρακτηριστικά ποσοτικά μεγέθη που επιδιώκεται να αριστοποιηθούν και τα οποία ονομάζονται παράμετροι αριστοποίησης (y_j).

Τα αποτελέσματα του πειράματος χρησιμοποιούνται προκειμένου να κατασκευασθεί το μαθηματικό μοντέλο του αντικειμένου που μελετάται. Έτσι, προκύπτει η εξίσωση συσχέτισης της παραμέτρου αριστοποίησης με τους παράγοντες που ονομάζεται συνάρτηση απόκρισης ή αντικειμενική συνάρτηση:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_v) \quad 6.1$$

6.1.2 Παράμετροι αριστοποίησης

Η παράμετρος αριστοποίησης αποτελεί την αντίδραση (απόκριση) στη δράση των παραγόντων που επιβάλλονται στο σύστημα που μελετάται. Οι παράμετροι αριστοποίησης ταξινομούνται:

- α) Ποσοτικές ή συνεχείς (πχ. απόδοση, χρώμα, κέρδος κ.α.)
- β) Ποιοτικές ή ασυνεχείς (πχ. γεύση, καταλληλότητα φαρμάκου κ.α.)

Για να επιλεγθεί η παράμετρος αριστοποίησης πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- α) Να είναι αποτελεσματική ως προς τον απώτερο σκοπό του πειράματος. Γι' αυτό, το πρόβλημα που μελετάται μέσω της πραγματοποίησης ενός παραγοντικού σχεδιασμού πρέπει να διατυπώνεται με σαφήνεια.
- β) Να έχει πληρότητα χαρακτηρισμού του αντικειμένου της έρευνας.
- γ) Να είναι ποσοτική ή να μπορεί να εκφραστεί με έναν απλό αριθμό. Για τις ποιοτικές παραμέτρους μπορεί να καθορισθεί μια αυθαίρετη κλίμακα με διαβαθμίσεις που θα δίνει μια ποσοτική εκτίμηση.
- δ) Να είναι στατιστικά αποτελεσματική, δηλαδή να προσδιορίζεται με ικανοποιητική ακρίβεια. Το σφάλμα στον προσδιορισμό ενός μεγέθους εκφράζεται από την τυπική απόκλιση s_y , η οποία θεωρείται σταθερή επομένως οι διακυμάνσεις s_y^2 πρέπει να είναι ομοιογενείς σε όλη την περιοχή του χώρου των παραγόντων που εξετάζεται.
- ε) Να έχει φυσική έννοια, να είναι απλή και να υπολογίζεται εύκολα. Πολλές φορές όταν οι διακυμάνσεις των μετρήσεων είναι ανομοιογενείς, δηλαδή όταν δεν επιτυγχάνεται η στατιστική αποτελεσματικότητα, τότε πραγματοποιείται μετασχηματισμός της παραμέτρου (πχ. $\sin y$) για να μετατραπούν οι διακυμάνσεις σε ομοιογενείς.
- στ) Να υπάρχει σε όλη την περιοχή του χώρου των παραγόντων που μελετάται.

6.1.3 Παράγοντες σχεδιασμού

Μία μετρήσιμη μεταβλητή που παίρνει συγκεκριμένη τιμή για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ονομάζεται παράγοντας. Οι παράγοντες αντιστοιχούν στους τρόπους επίδρασης στο αντικείμενο της έρευνας. Ωστόσο, υπάρχουν και μη ελέγξιμες ή απλά άγνωστες μεταβλητές που επιφέρουν επιπλέον σφάλματα στις τιμές της παραμέτρου αριστοποίησης.

Κάθε παράγοντας έχει και ένα πεδίο ορισμού, δηλαδή ένα σύνολο δυνατών τιμών που μπορεί να πάρει. Ανάλογα με τον τρόπο μέτρησης οι παράγοντες ταξινομούνται σε:

- α) Ποσοτικούς ή συνεχείς (πχ. θερμοκρασία, χρόνος, συγκέντρωση καταλύτη κ.α.)
- β) Δυαδικούς ή ασυνεχείς (πχ. τύπος καταλύτη, παρουσία ή μη καταλύτη κ.α.)

Στην αρχή, κατά τον σχεδιασμό των πειραμάτων οι παράγοντες είναι πολλοί, διότι πρέπει να συμπεριληφθούν όλοι οι πιθανοί. Καθώς προχωρούν τα πειράματα μειώνονται και κρατούνται οι στατιστικά σημαντικοί.

Γενικά, ο πειραματιστής πρέπει να μπορεί να διατηρεί σταθερό τον παράγοντα στο επιθυμητό επίπεδο κατά τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης, οι παράγοντες πρέπει να έχουν άμεση επίδραση στο αντικείμενο, καθώς είναι δύσκολο να ελεγχθούν αν εξαρτώνται από άλλους. Ταυτόχρονα, πρέπει να είναι ανεξάρτητοι ως προς τη θέση τους σε ένα επίπεδο.

Ακόμη, απαιτείται οι παράγοντες να είναι συμβιβαστοί, δηλαδή για οποιονδήποτε συνδυασμό των επιπέδων τους, τα πειράματα να μπορούν να πραγματοποιηθούν με επιτυχία και με ασφάλεια. Έτσι, είναι απαραίτητο να βρεθούν οι επικίνδυνες περιοχές πριν τον σχεδιασμό του πειράματος για να αποφευχθούν, για παράδειγμα, καταστροφές προϊόντων ή εγκαταστάσεων.

6.1.4 Μαθηματικά μοντέλα

Τα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται συνήθως σε στατιστικές προσομοιώσεις διαφόρων φαινομένων είναι πολυώνυμα μέχρι δευτέρου βαθμού, για λόγους απλότητας των εξισώσεων και ικανοποιητικής προσέγγισης. Τα μοντέλα αυτά είναι:

Μηδενικού βαθμού: $y = b_0$

Πρώτου βαθμού: $y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i$

Δεύτερου βαθμού: $y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k b_{ji} x_i x_j$

Οι συντελεστές των μοντέλων που πρέπει να προσδιορισθούν (άγνωστοι) είναι 1 στο μοντέλο μηδενικής τάξης (b_0) και $k+1$ στο πρώτης τάξης. Στο μοντέλο δεύτερης τάξης οι συντελεστές για προσδιορισμό είναι το άθροισμα αυτών του μοντέλου πρώτης τάξης, των αλληλεπιδράσεων και των τετραγωνικών όρων:

$$k + 1 + \frac{k!}{2!(k-2)!} + k = \frac{(k+1)(k+2)}{2} \quad 6.2$$

Δυνατότητες

Το μοντέλο μηδενικού βαθμού δείχνει ότι οι παράγοντες δεν επηρεάζουν την παράμετρο αριστοποίησης, μια κατάσταση που δεν έχει νόημα, αφού σκοπός της έρευνας είναι να βρεθεί και να καθορισθεί ποσοτικά αυτή η επίδραση. Το μοντέλο αυτό είναι αποτέλεσμα συνήθως ενός κακού σχεδιασμού ή μιας κακής εκτέλεσης του πειράματος.

Το μοντέλο πρώτου βαθμού είναι χρήσιμο και εύχρηστο. Έχει μεγάλη αξιοπιστία μέσα στα όρια σχεδιασμού του, και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μοντέλο παρεμβολής, δεν μπορεί να δώσει καμία πρόβλεψη έξω απ' αυτά τα όρια. Χρησιμοποιείται για εντοπισμό του αρίστου με κίνηση κατά την παράγωγο.

Στη περίπτωση αδυναμίας αυτού του μοντέλου να περιγράψει το αντικείμενο της έρευνας, γίνεται νέος σχεδιασμός δεύτερης τάξης για την επίτευξη μοντέλου δεύτερου βαθμού. Μία άλλη δυνατότητα είναι η συμπλήρωση των μετρήσεων πρώτου βαθμού με ορισμένες επιπλέον, έτσι ώστε να μετατραπεί το πρωτοβάθμιο μοντέλο σε δευτεροβάθμιο (πλαίσιαση αστέρα). Οι προβλέψεις των σχεδιασμών δεύτερης τάξης συνήθως είναι αναξιόπιστες έξω από τα όρια σχεδιασμού, επειδή όμως είναι εξαιρετικά καλές μέσα σε αυτά τα όρια, σπάνια είναι απαραίτητο να εξετασθούν πολυώνυμα τρίτου ή ανωτέρου βαθμού.

Αποφάσεις πριν τον σχεδιασμό

Της πρώτης σειράς μετρήσεων προηγείται η φάση της λήψης ορισμένων μη τυποποιημένων αποφάσεων για την επιλογή της τοπικής περιοχής μεταβολής κάθε παράγοντα. Τα όρια των πεδίων ορισμού του συνόλου των παραγόντων προσδιορίζονται, είτε με αξιωματικούς περιορισμούς, είτε με τεchnικοοικονομικές θεωρήσεις. Ο καθορισμός των περιοχών αυτών σχετίζεται με την προσεκτική ανάλυση γνωστών πληροφοριών από τη βιβλιογραφία, ή από προκαταρκτικά πειράματα, για τις μεταβολές των παραγόντων και για την καμπυλότητα της επιφάνειας απόκρισης.

Η τοπική περιοχή εκτέλεσης ενός πειράματος επιλέγεται με τους προσδιορισμούς του βασικού επιπέδου και των διαστημάτων μεταβολής. Το βασικό (μηδενικό) επίπεδο είναι ένα πολυδιάστατο σημείο του χώρου των παραγόντων. Ο σχεδιασμός ενός πειράματος συνίσταται στην επιλογή πειραματικών σημείων που να είναι συμμετρικά ως προς το βασικό επίπεδο. Σαν βασικό επίπεδο επιλέγεται γενικά το καλύτερο σημείο της βιβλιογραφίας ή των προκαταρκτικών πειραμάτων.

Το επόμενο στάδιο είναι η επιλογή του διαστήματος μεταβολής κάθε παράγοντα. Στον σχεδιασμό πρώτης τάξης επιλέγονται για κάθε παράγοντα δύο επίπεδα, στα σταθεροποιείται ο παράγοντας σε κάθε πείραμα. Το διάστημα μεταβολής ενός παράγοντα είναι η ποσότητα που όταν προστεθεί στο βασικό επίπεδο δίνει το ανώτερο και όταν αφαιρεθεί το κατώτερο επίπεδο.

Για διευκόλυνσή μας στο γράψιμο των συνθηκών του πειράματος και της επεξεργασίας των πειραματικών δεδομένων, το ανώτερο επίπεδο αντιστοιχεί στο +1 και το κατώτερο στο -1. Το βασικό επίπεδο αντιστοιχεί στο 0.

Άρα, γίνεται κωδικοποίηση των τιμών των παραγόντων με τον παρακάτω τύπο:

$$x_j = \frac{\tilde{x}_j - \tilde{x}_{j0}}{J_j} \quad 6.3$$

όπου:

x_j = κωδικοποιημένη τιμή του παράγοντα

\tilde{x}_j = φυσική τιμή του παράγοντα

\tilde{x}_{j0} = φυσική τιμή του βασικού επιπέδου του

j_j = διάστημα μεταβολής του

j = αριθμός του παράγοντα

6.2 Σχεδιασμοί πρώτης τάξης

6.2.1 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός

Ένα πείραμα στο οποίο πραγματοποιούνται όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί λέγεται παραγοντικό πείραμα (ή πλήρες παραγοντικό πείραμα). Εάν ο αριθμός των παραγόντων είναι k και ο αριθμός των επιπέδων 2 , τότε το πλήθος των μετρήσεων θα είναι :

$$N = 2^k$$

με συντεταγμένες, σε γεωμετρική παράσταση, τις κορυφές ενός υπερκύβου στο χώρο των k διαστάσεων.

6.2.2 Μήτρες σχεδιασμού πειραμάτων

Οι συνθήκες ενός πειράματος μπορούν να γραφούν στη μορφή ενός πίνακα, του οποίου οι γραμμές να αντιστοιχούν σε διαφορετικές μετρήσεις και οι στήλες στις τιμές των παραγόντων. Τέτοιοι πίνακες ονομάζονται μήτρες σχεδιασμού πειραμάτων (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Μήτρα σχεδιασμού πειραμάτων για ένα 2^2 παραγοντικό πείραμα.

No Μέτρησης	X_1	X_2	X_1X_2
1	+1	+1	+1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	-1	-1	+1

Στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 8) οι τιμές +1 και -1 είναι οι κωδικοποιημένες τιμές των παραγόντων και οι συνδυασμοί αυτών των επιπέδων καθορίζουν τις συνθήκες εκτέλεσης κάθε πειράματος. Στο εξής, στους σχεδιασμούς πρώτης τάξης, οι τιμές αυτές αντικαθίστανται με + και - αντίστοιχα.

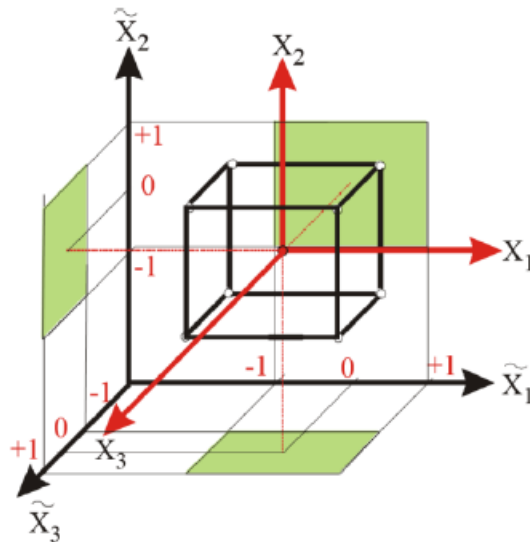
Η τελευταία στήλη του πίνακα χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων και προκύπτει σαν αλγεβρικό γινόμενο των αντίστοιχων στοιχείων των στηλών των παραγόντων.

Αντίστοιχα, απεικονίζεται η μήτρα ενός παραγοντικού πειράματος 2^3 (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Μήτρα σχεδιασμού πειραμάτων για ένα 2^3 πείραμα.

Νο Μέτρησης	X_1	X_2	X_3	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	$X_1X_2X_3$
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	-	-	-
3	+	-	+	-	+	-	-
4	+	-	-	-	-	+	+
5	-	+	+	-	-	+	-
6	-	+	-	-	+	-	+
7	-	-	+	+	-	-	+
8	-	-	-	+	+	+	-

Η γραφική παράσταση ενός παραγοντικού πειράματος 2^3 με μήτρα σχεδιασμού όπως η παραπάνω φαίνεται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4: Γραφική παράσταση ενός 2^3 πειράματος.

Σαν στήλη υπολογισμού του όρου μηδενικού βαθμού (b_0) θεωρείται γενικά μια στήλη με στοιχεία μόνο +1.

6.2.3 6.2.3 Ιδιότητες ενός παραγοντικού πειράματος

Οι ιδιότητες ενός παραγοντικού σχεδιασμού είναι :

α) Συμμετρία ως προς το κέντρο του σχεδιασμού :

$$\sum_{i=1}^N x_{ji} = 0 \quad 6.4$$

Όπου:

j = αριθμός του παράγοντα (1,2...,k) και
 i = αριθμός μέτρησης (1,2...,N)

β) Κανονικότητα της μήτρας σχεδιασμού που εκφράζεται από τη σχέση :

$$\sum_{i=1}^N x_{ji}^2 = N \quad 6.5$$

Αυτό είναι το αποτέλεσμα της χρησιμοποίησης κωδικοποιημένων τιμών (+1, -1) στη μήτρα σχεδιασμού.

γ) Ορθογωνικότητα της μήτρας σχεδιασμού που έχει σχέση με σύνθετες στήλες και πληρούνται με την ισχύ της εξίσωσης:

$$\sum_{i=1}^N x_{ji}x_{ui} = 0 \quad 6.6$$

όπου:

$j \neq u$ και

$j, u = 0, 1, 2, \dots, k$

δ) Περιστροφικότητα που προϋποθέτει ότι η ακρίβεια πρόβλεψης των τιμών της παραμέτρου αριστοποίησης είναι ίδια σε ίσες αποστάσεις από το κέντρο του σχεδιασμού και δεν εξαρτάται από την κατεύθυνση.

6.2.4 Βαθμοί ελευθερίας και αλληλεπιδράσεις

Ο αριθμός των συντελεστών μηδενικού και πρώτου βαθμού που πρέπει να προσδιορισθούν σε ένα παραγοντικό μοντέλο πρώτης τάξης είναι $k+1$. Η διαφορά μεταξύ του αριθμού των μετρήσεων και του αριθμού των συντελεστών (σταθερών) ενός μοντέλου ονομάζεται αριθμός των βαθμών ελευθερίας στη στατιστική, f :

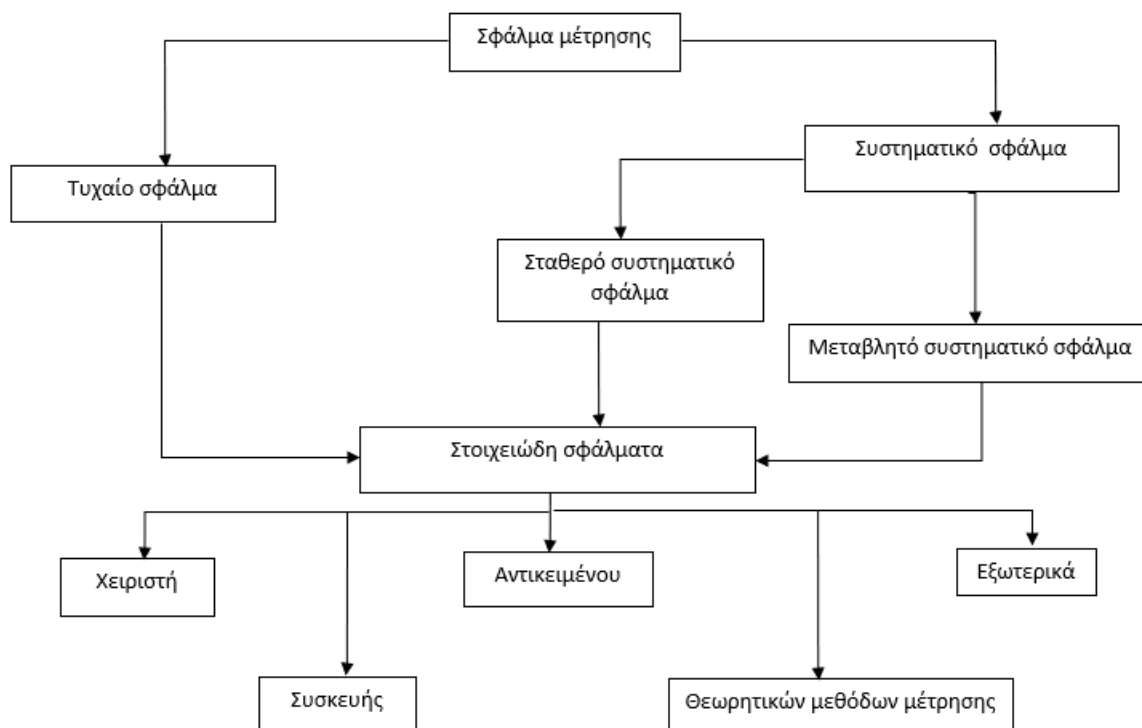
$$f = N - (k + 1) \quad 6.7$$

Ο ολικός αριθμός των μετρήσεων, N , ενός παραγοντικού πειράματος ισούται με τον ολικό αριθμό των συντελεστών, μηδενικών, πρώτου και ανωτέρων βαθμών (αλληλεπιδράσεις), λόγω της ορθογωνικότητας των μητρών σχεδιασμού. Οι βαθμοί ελευθερίας ενός παραγοντικού πειράματος ισούται με το πλήθος των αλληλεπιδράσεων του πειράματος.

6.3 Εκτέλεση του πειράματος

6.3.1 Σφάλματα επαναλήψεων και διακύμανση της παραμέτρου αριστοποίησης

Το σφάλμα μιας μέτρησης είναι το άθροισμα μιας σειράς μερικών σφαλμάτων, όπως είναι τα σφάλματα στη σταθεροποίηση των παραγόντων, στη μέτρηση της παραμέτρου αριστοποίησης, σφάλματα που οφείλονται στη γήρανση της συσκευής ή μιας από τις πρώτες ύλες κ.α. Κάθε ένα από τα σφάλματα αυτά, επίσης, μπορεί να διαιρεθεί στα συστατικά του.



Εικόνα 5: Διάγραμμα των συνιστωσών του σφάλματος μέτρησης.

Τα σφάλματα διαιρούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα συστηματικά και τα τυχαία σφάλματα.

Τα συστηματικά σφάλματα οφείλονται σε αιτίες που επενεργούν συνήθως προς μια ορισμένη κατεύθυνση. Πολύ συχνά αυτά τα σφάλματα μπορούν να μελετηθούν και να προσδιορισθούν ποσοτικά. Εάν τα συστηματικά σφάλματα οφείλονται σε εξωτερικές συνθήκες (μεταβολές της θερμοκρασίας, στην ποιότητα της πρώτης ύλης κ.λπ.) είναι απαραίτητο να αντισταθμιστεί αυτή η επίδοση.

Τα τυχαία σφάλματα είναι αυτά που εμφανίζονται ακανόνιστα, των οποίων οι αιτίες είναι άγνωστες και τα οποία είναι αδύνατο να εκτιμηθούν από πριν.

Τα συστηματικά και τα τυχαία σφάλματα αποτελούνται από άλλα στοιχειώδη. Από αυτά, όσα οφείλονται σε σφάλματα συσκευών, μπορούν να μειωθούν σημαντικά με έλεγχο των συσκευών πριν την παρατήρηση, μερικές φορές κατά την παρατήρηση και χωρίς αμφιβολία μετά την παρατήρηση. Εμφανίζονται και σφάλματα κατά την εκτέλεση της παρατήρησης που μπορεί να οφείλονται σε μη ομοιόμορφη θέρμανση του συστήματος, σε διαφορετικούς τρόπους θέρμανσης κ.α. Σε επαναλήψεις των μετρήσεων, τέτοια σφάλματα μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα μεγάλη διασπορά των πειραματικών σφαλμάτων.

Δεν επιτρέπεται να γίνονται αυθαίρετες διορθώσεις στις επαναλήψεις κάθε μέτρησης. Για την απαλλαγή των μετρήσεων από εσφαλμένες παρατηρήσεις χρησιμοποιείται το κριτήριο t του Student. Σύμφωνα με αυτό το κριτήριο μια ύποπτη για μεγάλη απόκλιση επανάληψη συγκρίνεται με τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση των υπόλοιπων τιμών, σύμφωνα με τη παρακάτω εξίσωση:

$$t_{exp} = \frac{y_i - y_{\mu\epsilon\sigma\sigma}}{s_i} \quad 6.8$$

Μία παρατήρηση απορρίπτεται, εάν η απόλυτη πειραματική τιμή t_{exp} είναι μεγαλύτερη από την τιμή του πίνακα Student t_{tab} για τον ίδιο βαθμό ελευθερίας και με στατιστική σημαντικότητα 95%. Αυτή η στατιστική σημαντικότητα είναι γενικά αποδεκτή για εργαστηριακά και βιομηχανικά χημικά πειράματα και με αυτή τη βάση γίνονται όλες οι στατιστικές εκτιμήσεις που ακολουθούν. Οι βαθμοί ελευθερίας των επαναλήψεων όπως σημειώθηκε και προηγουμένως ισούται με το πλήθος των επαναλήψεων μείον ένα.

Με τους ίδιους βαθμούς ελευθερίας εκτιμάται και η διακύμανση της παραμέτρου αριστοποίησης σύμφωνα με τη σχέση:

$$s_y^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 1} \quad 6.9$$

Αυτή η σχέση είναι αρκετή για την περίπτωση της εκτίμησης του σφάλματος προσδιορισμού της παραμέτρου αριστοποίησης από ένα μόνο σημείο του χώρου των παραγόντων, π.χ. από το κέντρο του σχεδιασμού. Στην περίπτωση όμως, που υπάρχουν επαναλήψεις και στις μετρήσεις του σχεδιασμού, περίπτωση που είναι και προτιμότερη γιατί επισημαίνει έγκαιρα μεγάλα σφάλματα, η διακύμανση πρέπει να υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$s_y^2 = \frac{\sum_{i=1}^m f_i s_i^2}{\sum_{i=1}^m f_i} \quad 6.10$$

Όπου s_i^2 είναι κάθε μία από τις διακυμάνσεις του σχεδιασμού που χρησιμοποιείται στον υπολογισμό της s_y^2 και f_i οι αντίστοιχοι βαθμοί ελευθερίας.

6.3.2 Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων

Ο έλεγχος της ομοιογένειας των διακυμάνσεων γίνεται με τη βοήθεια διαφόρων στατιστικών κριτηρίων. Το απλούστερο απ' αυτά είναι ο λόγος F (λόγος του Fisher) που έχει σχεδιασθεί για τη σύγκριση δύο διακυμάνσεων. Ο λόγος F είναι ο λόγος της μεγαλύτερης διακύμανσης προς τη μικρότερη. Η τιμή που προκύπτει συγκρίνεται με την αντίστοιχη τιμή του πίνακα των λόγων Fisher. Εάν ο λόγος F που υπολογίζεται είναι μεγαλύτερος από την τιμή που δίνεται στον πίνακα για τους αντίστοιχους βαθμούς ελευθερίας και την επιθυμητή στατιστική σημαντικότητα, αυτό σημαίνει ότι οι διακυμάνσεις διαφέρουν σημαντικά, δηλαδή δεν είναι ομοιογενείς.

Εάν ο αριθμός των διακυμάνσεων που συγκρίνονται είναι μεγαλύτερος από δύο και μια διακύμανση είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τις άλλες μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κριτήριο του Cochran. Αυτό είναι χρήσιμο σε περιπτώσεις που υπάρχει ο ίδιος αριθμός επαναλήψεων σε όλα τα σημεία. Το κριτήριο του Cochran είναι ο λόγος της μεγαλύτερης διακύμανσης προς το άθροισμα όλων των διακυμάνσεων:

$$G = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^N s_i^2} \quad 6.11$$

Η υπόθεση της ομοιογένειας των διακυμάνσεων επιβεβαιώνεται, όταν η πειραματική τιμή του G δεν ξεπερνά την αντίστοιχη τιμή του πίνακα.

6.3.3 Αντιμετώπιση σφαλμάτων

Για την αντιμετώπιση των τυχαίων σφαλμάτων το κριτήριο του Student βοηθάει στην απόρριψη των πιο απίθανων (εσφαλμένων) τιμών. Αυτό σε συνδυασμό με την εκτέλεση νέων επαναλήψεων μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των τυχαίων σφαλμάτων.

Για τη μείωση της επίδρασης των συστηματικών σφαλμάτων που οφείλονται σε εξωτερικές συνθήκες, συνίσταται η τυχαία σειρά εκτέλεσης των μετρήσεων της μήτρας σχεδιασμού.

Η αντιμετώπιση λοιπόν των σφαλμάτων προσδιορισμού της παραμέτρου αριστοποίησης γίνεται ως εξής:
 Τυχαία σφάλματα: Αντιμετώπιση με επαναλήψεις μετρήσεων
 Συστηματικά σφάλματα: Αντιμετώπιση με τυχαιοποίηση μετρήσεων

6.4 Επεξεργασία αποτελεσμάτων

6.4.1 Προϋποθέσεις

Οι προϋποθέσεις για να γίνει η επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι οι ακόλουθες:

- α) Η παράμετρος αριστοποίησης είναι μια τυχαία ποσότητα που υπακούει στο νόμο της κανονικής κατανομής.
- β) Η διακύμανση της παραμέτρου αριστοποίησης δεν εξαρτάται από την τιμή της (υπάρχει ομοιογένεια διακυμάνσεων)
- γ) Οι τιμές των παραγόντων δεν είναι τυχαίες ποσότητες, δηλαδή η τοποθέτηση και σταθεροποίηση κάθε παράγοντα στο προκαθορισμένο επίπεδο είναι πιο ακριβείς από το σφάλμα αναπαραγωγής.

6.4.2 Υπολογισμός συντελεστών συνάρτησης

Για τον υπολογισμό των συντελεστών μιας συνάρτησης απόκρισης χρησιμοποιείται ανάλυση παλινδρόμησης (regression analysis). Εξετάζεται πρώτα η απλή περίπτωση ενός γραμμικού μοντέλου με ένα παράγοντα :

$$y = b_0 + b_1 x_1 \quad 6.12$$

Στόχος εδώ είναι ο προσδιορισμός των αγνώστων συντελεστών b_0 και b_1 μετά την εκτέλεση ενός στατιστικού πειράματος και με τη χρησιμοποίηση των αποτελεσμάτων του.

Εάν όλα τα πειραματικά σημεία βρίσκονταν πάνω στην ευθεία που εκφράζεται με την παραπάνω εξίσωση, τότε θα ίσχυε η ακόλουθη εξίσωση για κάθε ένα από αυτά:

$$y_i - b_0 - b_1 x_{1i} = 0 \quad 6.13$$

όπου, $i=1, 2, \dots, N$ ο αριθμός κάθε μέτρησης. Σε αυτή την περίπτωση δεν θα υπήρχε πρόβλημα. Στην πράξη όμως αυτή η εξίσωση δεν ισχύει αλλά παίρνει τη μορφή:

$$y_i - b_0 - b_1 x_{1i} = \xi_i \quad 6.14$$

όπου ξ_i είναι η διαφορά μεταξύ πειραματικής, y_i , και υπολογισμένης με την αρχική εξίσωση τιμής του \hat{y}_i .

$$\xi_i = y_i - \hat{y}_i \quad 6.15$$

Η ποσότητα ξ αναφέρεται συχνά σαν υπόλοιπο.

Για ελαχιστοποίηση των αποκλίσεων (υπολοίπων) η πιο διαδεδομένη, ευρείας εφαρμογής μέθοδος είναι αυτή των ελάχιστων τετραγώνων, όπως αναπτύχθηκε πριν από περισσότερα από 150 χρόνια από τους A. Legendre και K. Gauss, και αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται στη συνέχεια. Σύμφωνα με τη μέθοδο των ελάχιστων τετραγώνων επιδιώκεται η ελαχιστοποίηση των τετραγώνων των υπολοίπων, δηλαδή:

$$\sum_{i=1}^N \xi_i^2 = \sum_{i=1}^N (y_i - b_0 - b_1 x_{1i})^2 = \min \quad 6.16$$

Το ελάχιστο μιας συνάρτησης, εάν υπάρχει, βρίσκεται με το σύγχρονο μηδενισμό των μερικών παραγώγων ως προς κάθε άγνωστο, όπως είναι γνωστό. Στη περίπτωση μας:

$$\frac{\partial(\xi_i^2)}{\partial b_0} = \frac{\partial(\xi_i^2)}{\partial b_1} = 0 \quad 6.17$$

Από αυτές τις εξισώσεις προκύπτουν:

$$-2 \sum_{i=1}^N (y_i - b_0 - b_1 x_{1i}) = 0 \quad 6.18$$

$$-2 \sum_{i=1}^N (y_i - b_0 - b_1 x_{1i}) x_{1i} = 0 \quad 6.19$$

Η ιδιότητα της συμμετρίας της μήτρας σχεδιασμού δίνει όμως:

$$\sum_{i=1}^N x_{1i} = 0 \quad 6.20$$

Οπότε οι προηγούμενες εξισώσεις γίνονται:

$$b_0 = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} \quad 6.21$$

και

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^N y_i x_{1i}}{\sum_{i=1}^N x_{1i}^2} \quad 6.22$$

Ο προσδιορισμός των συντελεστών μιας γραμμικής συνάρτησης απόκρισης με k παράγοντες :

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_k x_k \quad 6.23$$

γίνεται με όμοιο τρόπο με την εφαρμογή πολλαπλής παλινδρόμησης. Επομένως, ακολουθώντας πάλι την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, επιδιώκεται η ελαχιστοποίηση των τετραγώνων των υπολοίπων:

$$\sum_{i=1}^N \xi_i^2 = \sum_{i=1}^N (y_i - b_0 - b_1 x_{1i} - b_2 x_{2i} - \dots - b_k x_{ki})^2 = \min \quad 6.24$$

Παίρνοντας k+1 μερικές παραγώγους ως προς τους αγνώστους $b_0, b_1, b_2, \dots, b_k$, εξισώνοντάς τις με μηδέν και ανακατατάσσοντας, προκύπτουν οι k+1 εξισώσεις πολλαπλής παλινδρόμησης από τις οποίες τελικά προκύπτει:

$$b_0 = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} \quad 6.25$$

και

$$b_j = \frac{\sum_{i=1}^N y_i x_{ji}}{\sum_{i=1}^N x_{ji}^2} \quad 6.26$$

όπου $j = 1, 2, \dots, k$ ο αριθμός του παράγοντα. Στο σχεδιασμό πρώτης τάξης ισχύει επίσης η ιδιότητα της κανονικότητας της μήτρας σχεδιασμού, οπότε η (6.26) μετασχηματίζεται σε:

$$b_j = \frac{\sum_{i=1}^N y_i x_{ji}}{N} \quad 6.27$$

Οι συντελεστές των αλληλεπιδράσεων υπολογίζονται με όμοιο τρόπο από τη σχέση:

$$b_{uj} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i x_{ui} x_{ji}}{N} \quad 6.28$$

όπου $u, j=1, 2, \dots$, είναι οι αριθμοί των παραγόντων ($u \neq j$).

6.4.3 Έλεγχος σημαντικότητας συντελεστών

Για τον έλεγχο σημαντικότητας των συντελεστών του μαθηματικού μοντέλου, υπολογίζονται πρώτα οι διακυμάνσεις των συντελεστών από τη σχέση:

$$s_{bj}^2 = \frac{s_y^2}{\sum_{i=1}^N x_{ji}^2} = \frac{s_y^2}{N} \quad 6.29$$

Από την εξίσωση αυτή φαίνεται ότι σε μοντέλα πρώτης τάξης οι διακυμάνσεις όλων των συντελεστών είναι ίσες μεταξύ τους.

Το διάστημα εμπιστοσύνης με το οποίο θα συγκριθούν οι συντελεστές ώστε να ελεγχθεί η σημαντικότητα τους υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\Delta b_j = \pm t \cdot s_{bj} = \frac{t \cdot s_y}{\sqrt{N}} \quad 6.30$$

όπου t είναι η τιμή του πίνακα Student με στατιστική σημαντικότητα 95% και για τους βαθμούς ελευθερίας υπολογισμού της s_y .

Ένας συντελεστής είναι σημαντικός, εάν η απόλυτη τιμή του είναι μεγαλύτερη από το διάστημα εμπιστοσύνης του.

6.4.4 Έλεγχος επάρκειας μαθηματικού μοντέλου

Το άθροισμα των τετραγώνων των διαφορών των μέσων πειραματικών τιμών της παραμέτρου αριστοποίησης (\bar{y}) από τις αντίστοιχες υπολογισμένες τιμές με βάση το μαθηματικό μοντέλο που κατασκευάστηκε (\hat{y}), δίνει το υπόλοιπο άθροισμα των τετραγώνων.

Ο λόγος του υπολοίπου του αθροίσματος τετραγώνων με τους βαθμούς ελευθερίας ενός πειράματος δίνει την διακύμανση υπολοίπων ή διακύμανση επάρκειας (s_{ad}^2):

$$s_{ad}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N n_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}{f} \quad 6.31$$

όπου:

n_i = ο αριθμός επαναλήψεων στην i -στη σειρά της μήτρας σχεδιασμού πειραμάτων

f = βαθμοί ελευθερίας του σχεδιασμού.

Για τον έλεγχο της επάρκειας ενός γραμμικού μαθηματικού μοντέλου χρησιμοποιείται το γνωστό κριτήριο του Fisher, όπου ο λόγος F στην περίπτωση αυτή είναι:

$$F = \frac{s_{ad}^2}{s_y^2} \quad 6.32$$

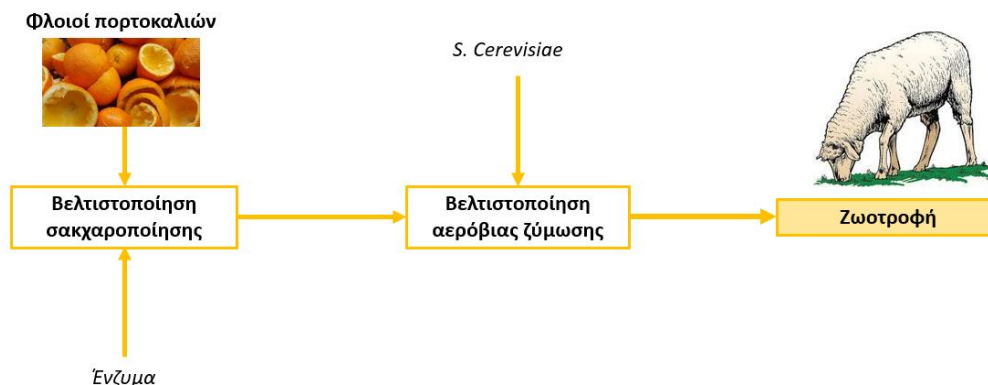
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η αξιοποίηση των αποβλήτων μιας βιομηχανίας παραγωγής χυμού πορτοκαλιού (φλούδες πορτοκαλιών) προκειμένου να παραχθεί μια βελτιωμένη ζωοτροφή που θα απευθύνεται σε μηρυκαστικά ζώα (πρόβατα). Προκειμένου μάλιστα να ληφθεί ένα συστατικό υψηλής θρεπτικής αξίας από τις φλούδες πορτοκαλιού, θα πρέπει να μειωθεί η περιεκτικότητα σε πηκτίνη και ελεύθερα σάκχαρα και να αυξηθεί η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Σύμφωνα με τους στόχους που περιγράφονται παραπάνω και μετά από αρκετές προκαταρκτικές δοκιμές, σχεδιάστηκε μια στρατηγική αξιοποίησης (Εικόνα 6). Στο πλαίσιο αυτής της στρατηγικής, μελετήθηκε η ενζυμική υδρόλυση των φλοιών πορτοκαλιού, από την οποία ελήφθη ένα υγρό κλάσμα πλούσιο σε σάκχαρα και ένα υδρολυμένο στερεό υπόλειμμα. Το υγρό κλάσμα χρησιμοποιήθηκε για καλλιέργεια μαγιάς με απώτερο στόχο την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης. Το τελικό προϊόν προέκυψε από την διαδοχική πραγματοποίηση των διεργασιών της ενζυμικής υδρόλυσης και της αερόβιας ζύμωσης και ήταν μίγμα υδρολυμένων φλοιών πορτοκαλιού με παραγόμενη μαγιά. Η τελική τροφή ξηράνθηκε για να σταθεροποιηθεί το προϊόν όσον αφορά τη διάρκεια ζωής και την ασφάλεια των ζωοτροφών.

Πιο συγκεκριμένα, σε πρώτη φάση διερευνήθηκε η βελτιστοποίηση των συνθηκών της παραγωγής γλυκόζης μέσω ενζυμικής υδρόλυσης (1^{ος} παραγοντικός σχεδιασμός) για τη μείωση της περιεκτικότητας σε πηκτίνη και την αύξηση σε πρωτεΐνες. Σε δεύτερη φάση, με την αξιοποίηση της υγρής φάσης που προέκυψε από την ενζυμική υδρόλυση και είναι πλούσια σε γλυκόζη διερευνήθηκε η βελτιστοποίηση των συνθηκών για την καλλιέργεια μαγιάς (2^{ος} παραγοντικός σχεδιασμός) και κατ' επέκταση η παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης, μέσω αερόβιας ζύμωσης, προκειμένου να καταναλωθούν τα σάκχαρα και να

αυξηθεί περαιτέρω η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης, υιοθετήθηκε ως μεθοδολογική προσέγγιση ο παραγοντικός πειραματικός σχεδιασμός.



Εικόνα 6: Πειραματικό διάγραμμα ροής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

7.1 ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ

Στην παρούσα διπλωματική ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκαν στερεά απόβλητα της βιομηχανίας πορτοκαλιού και πιο συγκεκριμένα φλοιοί πορτοκαλιού. Τα απόβλητα αυτά συλλέχθηκαν από τη βιομηχανία Hellenic Fruit Juices (HFJ) (βιομηχανία παραγωγής χυμών στη Σπάρτη) (<https://www.hfj.gr/>). Παραλήφθηκαν 2 παρτίδες αποβλήτων: μια στις 13 Δεκεμβρίου (700 kg) και μια στις 10 Μαΐου 2022 (περίπου 30 kg). Οι τροφοδοσίες αυτές στο εξής θα αναφέρονται ως τροφοδοσία 1 και 2 αντίστοιχα.

Μετά τη μεταφορά τους στις εγκαταστάσεις του Ε.Μ.Π., μέρος από την νωπή πρώτη ύλη χαρακτηρίστηκε φυσικοχημικά και το υπόλοιπο τοποθετήθηκε σε κατάψυξη για τη διατήρηση των χαρακτηριστικών της.

7.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

7.2.1.1 Προσδιορισμός ολικών στερεών TS

Τα δείγματα βιομάζας περιέχουν μεγάλη ποσότητα υγρασίας, η οποία αλλάζει με την έκθεσή τους στην ατμόσφαιρα. Γι' αυτό, είναι απαραίτητο η χημική τους ανάλυση να πραγματοποιείται και να αναφέρεται σε ξηρή βάση.

Για τον προσδιορισμό των ολικών στερεών TS ζυγίζεται ποσότητα 10 g για κάθε δείγμα βιοαποβλήτου σε ζυγό ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε προζυγισμένα ποτήρια ζέσεως και μπαίνουν στον φούρνο ξήρανσης Carbolite στους 105 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών τα δείγματα τοποθετούνται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά, μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και ζυγίζονται ξανά.

Το ποσοστό των ολικών στερεών υπολογίζεται από τον λόγο της τελικής μάζας m_f προς την αρχική m_i .

$$\%TS = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100$$

όπου:

m_f : η τελική μάζα του δείγματος

m_i : η αρχική μάζα του δείγματος

7.2.2 Προσδιορισμός πτητικών στερεών VS

Η ποσότητα του ανόργανου υλικού που εμπεριέχεται στην βιομάζα είναι είτε δομική είτε εκχυλίσιμη και θα πρέπει να μετράται ως μέρος της συνολικής σύνθεσης της βιομάζας. Η δομική τέφρα βρίσκεται δεσμευμένη στη φυσική δομή της βιομάζας, ενώ η εκχυλίσιμη μπορεί να αφαιρεθεί με έκπλυση ή εκχύλιση του δείγματος.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, ήταν η εξής:

Αρχικά, ζυγίστηκε περίπου 0.5 - 1 g για κάθε δείγμα TS και αυτά τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένες κάψες. Μετά, τα δείγματα μπήκαν στο φούρνο Barnstead Thermolyne στους 550 °C για 4 ώρες. Μετά το πέρας των 4 ωρών, οι κάψες αφήνονται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά, ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, ζυγίζονται ξανά οι κάψες μαζί με τα περιεχόμενα δείγματα.

Ο υπολογισμός των πτητικών ουσιών προκύπτει με βάση την αρχική και την τελική μάζα του ξηρού δείγματος και υπολογίζεται για όλα τα δείγματα όπως ακριβώς και με την υγρασία, με βάση τη σχέση:

$$\%TS = \frac{m_i - m_f}{m_i} \cdot 100$$

Όπου:

m_i : η αρχική μάζα ξηρού δείγματος και

m_f : η τελική μάζα μετά το πέρας των 4 ωρών στους 550 °C.

7.2.3 Προσδιορισμός ελαίων

Soxhlet

Ο προσδιορισμός των ελαίων σε στερεό πραγματοποιείται με εκχύλιση των ελαίων σε διάταξη Soxhlet, με χρήση εξάνιου. Το εξάνιο είναι ένας χημικά αδρανής και πτητικός μη πολικός διαλύτης. Για τον προσδιορισμό των ελαίων χρησιμοποιείται το αποξηραμένο δείγμα που έχει προκύψει από την διαδικασία προσδιορισμού των TS. Δηλαδή, ζυγίζονται περίπου 10 – 20 g ξηρού δείγματος και τοποθετούνται σε προζυγισμένη χαρτούσα. Επίσης, ζυγίζεται μία κυκλική φιάλη 24/29, με 6 – 7 glass beads. Σε αυτή εισάγεται εξάνιο, έως ότου η φιάλη να γεμίσει λίγο πιο πάνω από τη μέση. Στη συνέχεια, η χαρτούσα με το δείγμα βρέχεται ελάχιστα με εξάνιο, και τοποθετείται μαζί με την κυκλική φιάλη στο Soxhlet. Ακολουθεί το άνοιγμα της βρύσης και της διάταξης, ώστε να αρχίσει η θέρμανση. Η εκχύλιση διαρκεί 4 – 6 ώρες. Στο τέλος, η χαρτούσα τοποθετείται σε φούρνο στους 105 °C, ώστε να εξατμιστεί το εξάνιο και ζυγίζεται μετά από 2 – 24 ώρες.

Ο προσδιορισμός των ελαίων με βάση το στερεό προκύπτει με βάση την αρχική και τελική μάζα του στερεού στη χαρτούσα:

$$\%Oils = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100$$

όπου:

m_f : η τελική μάζα του στερεού στη χαρτούσα

m_i : η αρχική μάζα του στερεού στη χαρτούσα

Περιστροφικός εξατμιστήρας

Για την αποτελεσματική απομάκρυνση του εξάνιου από τα έλαια χρησιμοποιείται ο περιστροφικός εξατμιστήρας. Η φιάλη με το εξάνιο και τα εκχυλισμένα έλαια από την Soxhlet τοποθετείται στη διάταξη και ακολουθούν τα εξής βήματα:

1. Άνοιγμα βρύσης
2. Άνοιγμα διακόπτη της διάταξης
3. Ρύθμιση θερμοκρασίας στους 60 °C
4. Άνοιγμα αντλίας
5. Ρύθμιση κενού (μέχρι 400 mbar)
6. Ρύθμιση στροφών

Στο τέλος, αφού πρώτα αδειάσει η φιάλη με το ανακτημένο εξάνιο, εφαρμόζεται πλήρες κενό, ώστε να γίνει πλήρης εκχύλιση των ελαίων. Η φιάλη μπαίνει σε φούρνο στους 105 °C για μισή ώρα και αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, ζυγίζεται.

Ο προσδιορισμός γίνεται με βάση τη σχέση:

$$\%Oils = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100$$

όπου:

m_f : η τελική μάζα των λαδιών

m_i : η αρχική μάζα του στερεού στη χαρτούσα

7.2.4 Προσδιορισμός υδατοδιαλυτών στερεών WS

Πριν από τα επόμενα στάδια της ανάλυσης, είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν τα μη δομικά στοιχεία της βιομάζας για να αποφευχθούν τυχόν παρεμβολές. Τα υδατοδιαλυτά στερεά μπορεί να περιλαμβάνουν ανόργανα στοιχεία, μη δομικά σάκχαρα και αζωτούχες ουσίες. Τα ανόργανα στοιχεία στα υδατοδιαλυτά μπορεί να προέρχονται τόσο από την ίδια τη βιομάζα όσο και από οποιοδήποτε άλλο υλικό σχετίζεται με αυτή, όπως το χώμα και το λίπασμα.

Για τον προσδιορισμό των ολικών υδατοδιαλυτών στερεών αρχικά λαμβάνονται 1,25 g από κάθε δείγμα TS. Αυτά τοποθετούνται μαζί με 50 mL απιονισμένου νερού σε γυάλινα μπουκαλάκια τα οποία σφραγίζονται. Στη συνέχεια, τα γυάλινα μπουκαλάκια τοποθετούνται στο ανακινούμενο αερόλουτρο IKA KS 30001 control σε θερμοκρασία 50 °C και ταχύτητα ανάδευσης 130 rpm για 1 ώρα.

Μετά το πέρας της 1 ώρας, τα δείγματα διηθούνται, για να συλλεχθεί η στερεή και η υγρή φάση. Η στερεή φάση των δειγμάτων τοποθετείται σε προζυγισμένα ποτήρια ζέσεως, τα οποία μπαίνουν στον φούρνο ξήρανσης στους 105 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, τα δείγματα τοποθετούνται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά και ακολούθως ζυγίζονται.

Ο υπολογισμός των ολικών υδατοδιαλυτών γίνεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\%WS = \frac{m_i - m_f}{m_i} \cdot 100$$

Όπου:

m_i : η αρχική μάζα ξηρού δείγματος και

m_f : η τελική μάζα μετά το πέρας των 24 ωρών στους 105 °C.

7.2.5 Προσδιορισμός ολικού αζώτου με τη μέθοδο Kjeldahl

Η μέθοδος Kjeldahl εφαρμόζεται σε όλες τις απλές και σύνθετες ζωοτροφές. Με τη μέθοδο αυτή, το άζωτο των πρωτεϊνών και των μη πρωτεϊνικής φύσης ουσιών μετατρέπεται σε ανόργανο N (θειικό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) με πυκνό θειικό οξύ παρουσία καταλύτη. Στη συνέχεια, το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ μετατρέπεται σε θειικό νάτριο (Na_2SO_4) με καυστικό νάτριο (40% NaOH) και απελευθερώνεται αμμωνία (NH_3), η οποία συλλέγεται με απόσταξη σε ειδικό διάλυμα βορικού οξέος (receiver solution) και τιτλοδοτείται με διάλυμα H_2SO_4 0.1 N. Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας % των πρωτεϊνών, το προσδιοριζόμενο άζωτο πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή 6.25.

Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων οίκου KERN/ALS 120-4. Η χρήση του ζυγού περιγράφεται στην ΟΕ 702Γ-1.
- Ζυγός ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων οίκου METTLER TOLEDO/PB303-5.
- Συσκευή χώνευσης Gerhard Kjeldhatherm KB/KBL
- Σωλήνες Kjeldahl των 250 mL
- Συσκευή απόσταξης Gerhard Vapodest 30s
- Προχοϊδα βαθμονομημένη σε διαστήματα των 0.1 mL
- Κωνικές φιάλες των 250 mL

Χημικά αντιδραστήρια

- Διάλυμα σαλικυλικού οξέος / πυκνού θειικού οξέος (Φύλαξη D4d).

Διαλύονται 25 g σαλικυλικού οξέος ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$, Acros 147700010) σε 1 λίτρο πυκνού θειικού οξέος (98%, $\rho = 1,84 \text{ g/cm}^3$).

- Μίγμα καταλύτη: $\text{K}_2\text{SO}_4 - \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - \text{TiO}_2$ (Φύλαξη D4d).

Αλέθονται και αναμειγνύονται 200 g θειικού καλίου (K_2SO_4 , Merck 1.05153.1000), 6 g πενταένυδρου θειικού χαλκού ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck 1.02787.1000) και 6 g διοξειδίου του τιτάνιου (TiO_2 , με την κρυσταλλική δομή του ανατάσιου, Merck 1.00808.1000).

- Πενταένυδρο θειοθειικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, Merck 1.06516.1000, Φύλαξη D4d).

Αλέθονται οι κρύσταλλοι $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ για να σχηματίσουν την σκόνη που περνά από κόσκινο 0.25 mm.

- Υδροξείδιο του νατρίου $c(\text{NaOH}) = 10 \text{ mol / l}$ (Φύλαξη D4d).

Διαλύονται 400 g καυστικού νατρίου σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού.

- Διάλυμα βορικού οξέος, $\rho(\text{H}_3\text{BO}_3) = 20 \text{ g / l}$ (Φύλαξη D4d).

Διαλύονται 20 g βορικού οξέος (Panreac 131015.1211) σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού.

- Μικτός δείκτης - MI5 (Merck 1.06130.0250, Φύλαξη D4d)

- Θειικό οξύ $c(\text{H}^+) = 0,1 \text{ mol / l}$ (Φύλαξη D4d).

Αραιώνεται η αμπούλα σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού ή χρησιμοποιείται το έτοιμο πρότυπο εμπορείου.

- Θειικό οξύ $c(\text{H}^+) = 0,01 \text{ mol / l}$ (Φύλαξη D4d).

Αραιώνονται τα 100 mL Θεϊκού οξέως $c(H^+) = 0,1 \text{ mol / l}$ (6.7) σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού.

Διαδικασία Ανάλυσης

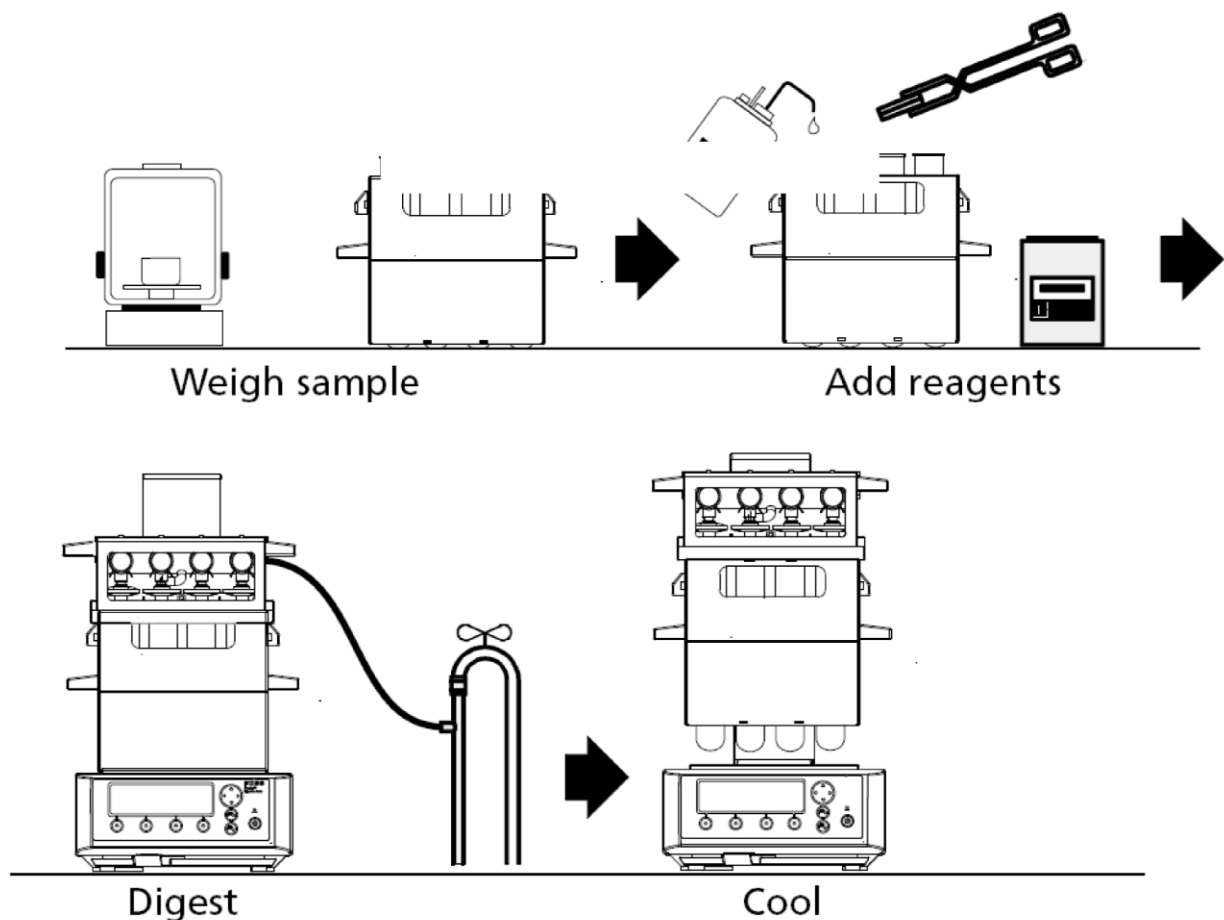
Διαδικασία χώνευσης

Σε κάθε σωλήνα Kjeldahl μεταφέρονται 0.5 g από κάθε στερεό δείγμα και στη συνέχεια προστίθενται 20 mL του διαλύματος σαλικυλικού οξέος σε θειικό οξύ. Σε κάθε παρτίδα αναλύσεων συμπεριλαμβάνεται ένας άδειος (χωρίς δείγμα) σωλήνας που χρησιμεύει σαν τυφλή δοκιμή με σκοπό την ανίχνευση παρουσίας NH_3 που δεν οφείλεται στο δείγμα και ένας σωλήνας με δείγμα compost για τον έλεγχο της ανάλυσης. Οι σωλήνες ανακινούνται για να αναμιχθεί το στερεό δείγμα με το οξύ και αφήνονται για όλη τη νύχτα.

Έπειτα, σε κάθε σωλήνα εισάγονται 2.5 g $Na_2S_2O_3$ και οι σωλήνες ανακινούνται, μεταφέρονται στην εστία καύσης με ειδικό στατό, συνδέονται με τον πολλαπλό απαγωγό και θερμαίνονται για 30 λεπτά στους $170 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$ (Program 5).

Στη συνέχεια, αφού ψυχθούν οι σωλήνες για 15 λεπτά εισάγονται 5.5 g μίγματος καταλύτη. Ανακινούνται και τοποθετούνται ξανά στην συσκευή καύσης όπου θερμαίνονται στους $400 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$ για 2 ώρες (Program 6.1). Ακολουθεί, ψύξη για 10 λεπτά στους $300 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$ και για 10 λεπτά στους $200 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$ (Program 6.2).

Στο τέλος της χώνευσης οι σωλήνες αφήνονται να ψυχθούν.



Εικόνα 7: Διαδικασία χώνευσης.

Διαδικασία απόσταξης

Μετά την ψύξη, ο κάθε σωλήνας μεταφέρεται στη συσκευή Vapodest όπου γίνεται αυτόματη απόσταξη. Μέσα στον σωλήνα προστίθενται αυτόματα 100 mL διαλύματος καυστικού νατρίου 40% w/w και 100 mL απιονισμένου νερού (για την διαλυτοποίηση των θειικών αλάτων).

Στη συνέχεια, μέσω ατμογεννήτριας εισέρχεται στον σωλήνα ατμός, ο οποίος αναδεύει το μείγμα και υποβοηθά στην αντίδραση του $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ με το NaOH για την άμεση απελευθέρωση της NH_3 .

Η εκλυόμενη NH_3 συμπυκνώνεται και υγροποιείται στον ψυκτήρα της συσκευής και συλλέγεται στην κωνική φιάλη που περιέχει το διάλυμα υποδοχής, δηλαδή με 25 mL βορικού οξέος, και 3-4 σταγόνες δείκτη.

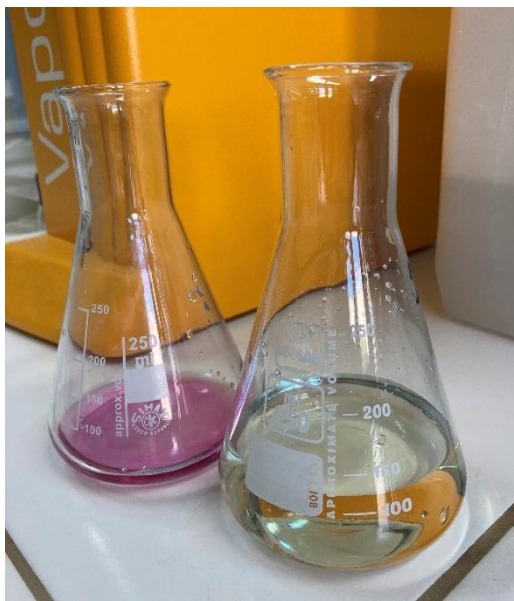
Με την προσθήκη της NH_3 στο διάλυμα υποδοχής σχηματίζεται πράσινο χρώμα.



Εικόνα 8: Συσκευή αυτόματης απόσταξης Vapodest.

Διαδικασία τιτλοδότησης

Γίνεται τιτλοδότηση με διάλυμα 0.1 N H_2SO_4 μέχρι την πλήρη εξουδετέρωση της NH_3 , η οποία καθορίζεται από ένα ροζ – βιολετί χρωματισμό λόγω του δείκτη. Καταγράφεται ο όγκος του οξέος που χρησιμοποιήθηκε για το τυφλό δείγμα και για κάθε δείγμα.



Εικόνα 9: Τιτλοδότηση

7.2.6 Προσδιορισμός κυτταρίνης

Η διαδικασία προσδιορισμού κυτταρίνης συνίσταται στην όξινη υδρόλυση του στερεού υπολείμματος που προέκυψε από τον προσδιορισμό των ολικών υδατοδιαλυτών στερεών. Περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Λαμβάνονται 300 mg από το κάθε δείγμα στερεού υπολείμματος που προέκυψε κατά τον προσδιορισμό WS και τοποθετούνται σε γυάλινα μπουκαλάκια. Εκεί προστίθενται 3 mL H₂SO₄ 72% w/w.
- Τα γυάλινα μπουκαλάκια σφραγίζονται και τοποθετούνται σε ανακινούμενο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C και ταχύτητα ανάδευσης 150 rpm για 1 ώρα.
- Μετά το πέρας 1 ώρας προστίθενται σε κάθε μπουκαλάκι 84 mL απιονισμένου νερού και τα δείγματα τοποθετούνται στον αποστειρωτή ISOLAB Laborgerate GmbH Autoclave για μία ώρα και σε θερμοκρασία 121 °C.
- Μετά την αποστείρωση, τα δείγματα αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία διηθούνται. Τα διηθήματα αποθηκεύονται σε falcon tubes των 50 mL, ενώ τα στερεά υπολείμματα σε πορσελάνινες κάψες.
- Από τα διηθήματα που προκύπτουν λαμβάνονται 20 mL από το καθένα και εξουδετερώνονται, υπό ανάδευση, με χρήση CaCO₃ έως ότου το pH να κυμαίνεται μεταξύ 5 και 5,5.
- Μετά την εξουδετέρωση τα δείγματα αφήνονται να ηρεμήσουν και συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό μέσω φυγοκέντρησης.
- Το συλλεχθέν υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος αραιώνεται κατάλληλα και ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού της ελεύθερης γλυκόζης GOD/PAP. Από το υπερκείμενο υγρό λαμβάνονται 100 μL τα οποία τοποθετούνται σε γυάλινα φιαλίδια στα οποία προστίθενται και 2

mL αντιδραστηρίου σακχάρου. Ακολούθως, τα φιαλίδια τοποθετούνται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C για 15 λεπτά. Τέλος, λαμβάνει χώρα φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510 nm.

Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στη κατασκευασμένη καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP και στη συνέχεια με βάση τις σχέσεις που ακολουθούν προσδιορίζεται η συγκέντρωση κυτταρίνης.

$$Total\ gluc\ \left(\% \frac{w}{w}\right) = \frac{0.6254 \cdot ABS_{mean} \cdot 86.73 \cdot 10^{-3} \cdot 100}{Initial\ solid} \cdot 0.897$$

Όπου:

ABS_{mean} : ο μέσος όρος απορρόφησης

D: Η αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα

86,73 (mL): προκαθορισμένη τιμή

Initial solid: η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης

0,897: συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης

Τελικά, η ποσότητα της κυτταρίνης υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$Κυτταρίνη\ \left(\% \frac{w}{w}\right) = Total\ gluc\ \left(\% \frac{w}{w}\right) \cdot 0.9$$

Όπου:

$$0.9 = \frac{162}{180} = \text{συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης}$$

7.2.7 Προσδιορισμός ημικυτταρίνης

Από το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε μετά την εξουδετέρωση κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης λαμβάνονται 0.5 mL από κάθε δείγμα και τοποθετούνται σε γυάλινα φιαλίδια. Σε αυτά προστίθενται 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και τα δείγματα αφήνονται σε βραστό νερό για 5 λεπτά. Μετά, προστίθενται 4 mL νερού στο καθένα και ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 540 nm.

Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στην κατασκευασμένη καμπύλη αναφοράς της ημικυτταρίνης και στη συνέχεια με βάση τις σχέσεις που ακολουθούν προσδιορίζεται η συγκέντρωση ημικυτταρίνης.

Αρχικά υπολογίζεται η απορρόφηση της ξυλόζης στα 540 nm:

$$ABS_{xyl} = ABS_{hcell} - ABS_{glu}$$

$$ABS_{glu} = 0.6591 \cdot C_{glu}$$

όπου:

ABS_{xyl} : η απορρόφηση της ξυλόζης σε μήκος κύματος 540 nm

ABS_{hcell} : ο μέσος όρος απορρόφησης σε μήκος κύματος 540 nm, η οποία μετρήθηκε στο συγκεκριμένο στάδιο

C_{glu} : η συγκέντρωση γλυκόζης που μετρήθηκε στον προσδιορισμό της κυτταρίνης

ABS_{glu} : η απορρόφηση στα 540 nm που προκύπτει εισάγοντας την C_{glu} , στην καμπύλη αναφοράς γλυκόζης με τη μέθοδο DNS

Κατόπιν, υπολογίζεται η συγκέντρωση ξυλόζης:

$$Total\ xylose(mg/mL) = \frac{1.4268 \cdot ABS_{xyl}}{0.86}$$

όπου:

0.86: συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της ξυλόζης

Τέλος, η ποσότητα της ημικυτταρίνης υπολογίζεται από τη σχέση:

$$Ημικυτταρίνη\ (%w/w) = \frac{(Total\ xylose) \cdot \left(\frac{M_{R,hcell}}{M_{R,xylose}}\right) \cdot 86.73}{Initial\ Solid} \cdot 100$$

όπου:

$$\frac{M_{R,hcell}}{M_{R,xylose}} = \frac{132}{150}$$

86.73 (mL): προκαθορισμένη τιμή του συνολικού όγκου

Initial Solid (mg): η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης

7.2.8 Προσδιορισμός λιγνίνης

- Διαλυτή λιγνίνη

Από το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε μετά την εξουδετέρωση κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης λαμβάνονται 5 mL από κάθε δείγμα και στη συνέχεια τα δείγματα υφίστανται φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 320 nm.

Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στη κατασκευασμένη καμπύλη αναφοράς της λιγνίνης και στη συνέχεια με βάση τις σχέσεις που ακολουθούν προσδιορίζεται η συγκέντρωση λιγνίνης:

$$Λιγνίνη\ (%w/w) = \frac{ABS_{mean} \cdot D \cdot 0.08673}{\epsilon \cdot Initial\ Solid \cdot Pathlength} \cdot 100$$

όπου:

ABS_{mean} : ο μέσος όρος απορρόφησης

D: Η αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα

86,73 (mL): προκαθορισμένη τιμή

initial solid (g): η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης

Pathlength (cm): το μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας – μήκος κυψελίδας (1 cm)

ϵ : σταθερά που εξαρτάται από το είδος της πρώτης ύλης ($\epsilon=30\ L/(g \cdot cm)$)

- Μη διαλυτή λιγνίνη

Οι πορσελάνινες κάψες με τα στερεά υπολείμματα που έχουν προκύψει κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης τοποθετούνται στο φούρνο ξήρανσης στους 105 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών αφήνονται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά και κατόπιν ζυγίζονται. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στο φούρνο στους 575 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών αφήνονται στον αφυγραντήρα για περίπου 15 λεπτά και ξαναζυγίζονται. Από τη διαφορά των δυο μαζών που μετρήθηκαν προκύπτει το ποσοστό της μη διαλυτής λιγνίνης, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Μη διαλυτή λιγνίνη} = \frac{m_{105} - m_{575}}{\text{Initial Solid}} \cdot 100$$

όπου:

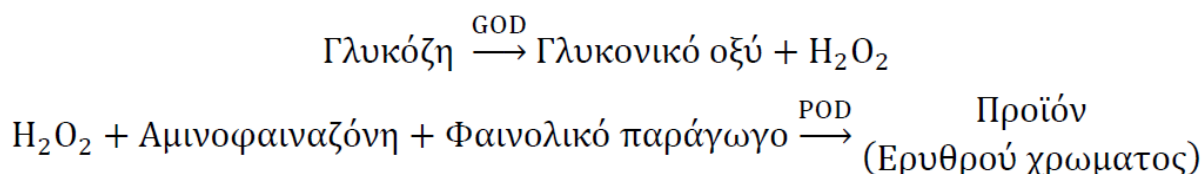
m_{575} : η μάζα του δείγματος που βγήκε από το φούρνο στους 575 °C

m_{105} : η μάζα του δείγματος που βγήκε από το φούρνο στους 105 °C

Initial solid: η μάζα του δείγματος που λήφθηκε από τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της κυτταρίνης

7.2.9 Προσδιορισμός ελεύθερης γλυκόζης

Η μέθοδος προσδιορισμού της γλυκόζης βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος, που είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Αρχικά, η γλυκόζη με τη δράση της οξειδάσης μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στη συνέχεια, το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσιάζει αμινοφαιναζόνη και κάποιου φαινολικού παραγώγου με τη δράση της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε κάποιο προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm. Οι 2 αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω (GOD=οξειδάση, POD=υπεροξειδάση):



Κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο GOD/PAP

Για τον προσδιορισμό της ελεύθερης γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP κατασκευάζεται πρώτα η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης, με την παρακάτω μέθοδο:

1. Χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα γλυκόζης 1 g/L. Πραγματοποιούνται αραιώσεις του παραπάνω διαλύματος με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα γλυκόζης 0.25, 0.50, 0.75 g/L.
2. Σε 8 δοκιμαστικούς σωλήνες (δύο για κάθε συγκέντρωση γλυκόζης) προστίθενται 2 mL διαλύματος εργασίας και 0.1 mL από το κάθε διάλυμα γλυκόζης.
3. Στη συνέχεια, σε δύο ακόμα δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 2 mL διαλύματος εργασίας και 0.1 mL απιονισμένου νερού (τυφλό).
4. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C για 10 min.
5. Επιλέγεται στο φωτόμετρο το μήκος κύματος των 510 nm. Το όργανο μηδενίζεται με απιονισμένο νερό και οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται στη συσκευή Vortex – Genie 2, της εταιρείας Scientific Industries, και μετρούνται οι απορροφήσεις των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

Για τον προσδιορισμό της ελεύθερης γλυκόζης στα προς μελέτη υλικά άγνωστης συγκέντρωσης, χρησιμοποιήθηκαν τα διηθήματα που προέκυψαν μετά από την ενζυμική υδρόλυση των δειγμάτων. Στα διηθήματα αυτά, αρχικά πραγματοποιήθηκε η κατάλληλη αραιώση. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες 2 mL διαλύματος εργασίας και 0,1 mL διηθήματος από κάθε αραιωμένο διάλυμα. Για την παρασκευή του τυφλού, προστέθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 2 mL διαλύματος εργασίας και 0,1 mL απιονισμένου νερού. Ακολούθως, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν για επώαση στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C για 10 λεπτά.

Μετά το πέρας της επώασης κάθε ένας δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύεται στη συσκευή Vortex-Genie 2 και ακολουθεί η φωτομέτρηση, σε φωτόμετρο Spectroquant Pharo 300 Merck, σε μήκος κύματος 510 nm. Το φωτόμετρο πριν την έναρξη της φωτομέτρησης των δειγμάτων μηδενίστηκε με απιονισμένο νερό.

Τέλος, η ελεύθερη γλυκόζη υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{Ελεύθερη γλυκόζη} \left(\% \frac{w}{w} \right) = \frac{0.6254 \cdot \text{ABS}_{\text{mean}} \cdot D \cdot V \cdot 10^{-3}}{\text{Initial Solid}} \cdot 100$$

όπου:

ABS_{mean} : ο μέσος όρος απορρόφησης

D: η αραιώση που έχει πραγματοποιηθεί στο διάλυμα

V: ο συνολικός όγκος του διηθήματος

Initial solid: η αρχική μάζα του δείγματος

7.2.10 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων, TRS

Οι υδατάνθρακες χωρίζονται στις εξής 3 κατηγορίες:

1. Μονοσακχαρίτες: Οι μονοσακχαρίτες είναι εκείνοι οι υδατάνθρακες που δεν μπορούν να υδrolυθούν περεταίρω για να δώσουν απλούστερες μορφές πολύ-υδροξυ- μονάδων αλδεΐδης ή κετόνης. Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα και την ομάδα που φέρουν στο μόριό τους σε τριόζες (με 3 άτομα άνθρακα), πεντόζες (με 5 άτομα άνθρακα), εξόζες (με 6 άτομα άνθρακα) κλπ. Επίσης, αν ο μονοσακχαρίτης φέρει στο μόριό του μια αλδεΐδική ομάδα ανήκει στην ομάδα των αλδόζων, ενώ αν έχει μια κετονική ομάδα ανήκει στην ομάδα των κετόζων. Υπάρχουν περίπου 20 μονοσακχαρίτες στη φύση και οι περισσότεροι περιέχουν συνήθως 5 (πεντόζες) ή 6 (εξόζες) άτομα άνθρακα: γλυκόζη, φρουκτόζη, ριβόζη, αραβινόζη, ξυλόζη κ.λπ.
2. Ολιγοσακχαρίτες: Οι ολιγοσακχαρίτες είναι οι υδατάνθρακες που κατά την υδρόλυσή τους μπορούν να δώσουν από 2 έως 10 μονάδες μονοσακχαριτών. Ανάλογα με τον αριθμό των μονοσακχαριτών που προκύπτουν από την υδρόλυση, διακρίνονται σε δισακχαρίτες, τρισακχαρίτες, τετρασακχαρίτες κ.λπ. Χαρακτηριστικά παραδείγματα δισακχαριτών είναι η σακχαρόζη, η οποία κατά την υδρόλυση δίνει ισομοριακό μίγμα γλυκόζης και φρουκτόζης και η μαλτόζη, η οποία κατά την υδρόλυση δίνει 2 μόρια γλυκόζης.
3. Πολυσακχαρίτες: Οι πολυσακχαρίτες κατά την υδρόλυσή τους παράγουν μεγάλο αριθμό μονοσακχαριτών. Παραδείγματα τέτοιων είναι το άμυλο, η κυτταρίνη, το γλυκογόνο κλπ.

Επιπλέον, οι υδατάνθρακες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως αναγωγικοί ή μη αναγωγικοί. Οι αναγωγικοί υδατάνθρακες είναι εκείνοι που μπορούν να λειτουργήσουν ως αναγωγικοί παράγοντες λόγω της παρουσίας ελεύθερης αλδεϋδικής ή κετονικής ομάδας στο μόριό τους. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται από τη μέθοδο DNS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων σε ένα διάλυμα. Η αναγωγή του 5-δινιτροσαλικυλικού οξέος οδηγεί στο σχηματισμό ενός προϊόντος 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικού οξέος το οποίο εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540 nm.

Διαδικασία προσδιορισμού

α) Παρασκευή διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος

- Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα NaOH συγκέντρωσης 22.86 g/L και όγκου 700 mL.
- Στο διάλυμα NaOH (στάδιο 1) προστίθενται 10 g άνυδρου 3.5- δινιτροσαλικυλικού οξέος (αν το αντιδραστήριο είναι ένυδρο υπολογίζεται η ανάλογη ποσότητα).
- Το προκύπτον διάλυμα τίθεται υπό ανάδευση και ελαφρά θέρμανση, μέχρι την πλήρη διάλυση του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος.
- Στο προκύπτον διάλυμα του σταδίου 2 προστίθενται σταδιακά 300 g άνυδρου τρυγικού καλιονατρίου (αν το αντιδραστήριο είναι ένυδρο υπολογίζεται η ανάλογη ποσότητα). Το διάλυμα εξακολουθεί να αναδεύεται υπό ελαφρά θέρμανση.
- Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης του τρυγικού καλιονατρίου και την πλήρη διάλυσή του, το προκύπτον διάλυμα ογκομετρείται μέχρι το 1 L (με χρήση της κατάλληλης ογκομετρικής φιάλης).
- Το τελικό διάλυμα φυλάσσεται σε φιάλη σκούρου χρώματος, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ο χρόνος ζωής του είναι περίπου 6 μήνες.

β) Ποσοτικοποίηση των αναγωγικών σακχάρων (κατασκευή καμπύλης αναφοράς γλυκόζης και ξυλόζης)

- Χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 2.0 mg/mL. Πραγματοποιούνται αραιώσεις του παραπάνω διαλύματος με απιονισμένο νερό έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα γλυκόζης τελικής συγκέντρωσης 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 και 2.0 mg/mL.
- Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0.5 mL διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος και 0.5 mL από το κάθε διάλυμα γλυκόζης. Τα προκύπτοντα διαλύματα αναμιγνύονται καλά σε συσκευή vortex.
- Σε δύο ακόμα δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0.5 mL απιονισμένου νερού και 0.5 mL διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος.
- Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε νερό που βράζει. Μετά από ακριβώς 5 min απομακρύνονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες από το νερό και προστίθεται σε κάθε ένα από αυτούς 4 mL απιονισμένο νερό.
- Επιλέγεται στο φωτόμετρο το μήκος κύματος των 540 nm. Μηδενίζεται το όργανο με το διάλυμα που περιέχει το απιονισμένο νερό, και μετρώνται οι απορροφήσεις των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης γλυκόζης.
- Υπολογίζονται οι μέσοι όροι των λαμβανόμενων απορροφήσεων και κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης (απορρόφηση ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος). Υπολογίζεται η βέλτιστη ευθεία με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Με εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου μπορεί να κατασκευαστεί καμπύλη αναφοράς οποιουδήποτε αναγωγικού σακχάρου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι απαιτείται κατασκευή νέας καμπύλης αναφοράς αναγωγικών σακχάρων κάθε φορά που παρασκευάζεται νέο διάλυμα 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος.

γ) Προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων

- Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 0.5 mL δείγματος προς προσδιορισμό, ακολουθεί προσθήκη 0.5 mL διαλύματος 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος και το προκύπτον μίγμα αναμιγνύεται σε συσκευή vortex. Επιπλέον, σε άλλον ένα δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 0.5 mL απιονισμένου νερού, 0.5 mL διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος και το προκύπτον μίγμα αναμιγνύεται σε συσκευή vortex.
- Ακολουθεί βρασμός για χρόνο 5 min προκειμένου να γίνει αναγωγή του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος.
- Μετά το βρασμό προστίθενται 4 mL απιονισμένου νερού και ανάμιξη σε συσκευή vortex.
- Τα δείγματα φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 540 nm. Για τον μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιείται το δείγμα που περιέχει το απιονισμένο νερό.

Για τον υπολογισμό των αναγωγικών σακχάρων, γίνεται η παραδοχή ότι αποτελούνται μόνο από ξυλόζη. Οι μετρούμενες απορροφήσεις εισάγονται στην κατασκευασμένη καμπύλη αναφοράς για το DNS και στη συνέχεια με βάση τις σχέσεις που ακολουθούν προσδιορίζεται η συγκέντρωση TRS.

Αρχικά, υπολογίζεται η απορρόφηση της ξυλόζης στα 540 nm:

$$ABS_{xyl} = ABS_{hcell} - ABS_{glu}$$
$$ABS_{glu} = 0.6591 \cdot C_{glu}$$

όπου:

ABS_{xyl} : η απορρόφηση της ξυλόζης σε μήκος κύματος 540 nm

ABS_{hcell} : η απορρόφηση σε μήκος κύματος 540 nm, η οποία μετρήθηκε στο συγκεκριμένο στάδιο

C_{glu} : συγκέντρωση γλυκόζης που έχει μετρηθεί

ABS_{glu} : η απορρόφηση στα 540 nm που προκύπτει εισάγοντας την C_{glu} , στην καμπύλη αναφοράς γλυκόζης με τη μέθοδο DNS

Στη συνέχεια, υπολογίζεται η σύσταση κατά βάρος των TRS:

$$TRS \left(\% \frac{w}{w} \right) = \frac{1.4268 \cdot ABS_{xyl}}{0.86} \cdot \frac{1}{Initial\ Solid} \cdot V \cdot 100$$

όπου:

0.86: συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της ξυλόζης

Initial Solid: αρχικό στερεό

V: συνολικός όγκος υγρού

7.2.11 Προσδιορισμός αιθανόλης

Η αιθανόλη απαντάται παντού στη φύση, γι' αυτό και ο ποσοτικός προσδιορισμός της είναι σημαντικός για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών, οίνων και μπίρας, αλλά και για ποτά μικρής περιεκτικότητας σε αλκοόλ και μη αλκοολούχα όπως οι χυμοί, και τρόφιμα όπως οι μαρμελάδες, τα γλυκά, το μέλι, οι σοκολάτες και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Επίσης, σημαντικές ποσότητες αιθανόλης περιέχουν και καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα.

Η αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) καταλύει την οξείδωση της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη σε συνδυασμό με την αναγωγή του δινουκλεοτιδίου της νικοτιναμίδης αδενίνης (NAD⁺).



Η ποσότητα του NADH που προκύπτει από την παραπάνω αντίδραση βρίσκεται σε στοιχειομετρία με την ποσότητα της αιθανόλης.

Ο προσδιορισμός της αιθανόλης, πραγματοποιείται σε δείγματα μετά το στάδιο της ζύμωσης. Η μέθοδος περιλαμβάνει την χρήση του κατάλληλου πακέτου αντιδραστηρίων του εργαστηρίου (Megazyme 2018).

Τα βήματα είναι τα εξής:

- Εισαγωγή 2 mL αντιδραστηρίου Reagent 1 σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα.
- Προσθήκη με πιπέτα 0.1 mL του υγρού δείγματος ή απιονισμένου νερού στην περίπτωση του blank και αναμονή για 3 λεπτά.
- Μετά το πέρας των 3 λεπτών, προσθήκη με πιπέτα 0.5 mL του αντιδραστηρίου Reagent 2 και αναμονή για 7 λεπτά.
- Μετά το πέρας των 7 λεπτών μεταφορά του δείγματος σε κυψελίδα και φωτομέτρηση.

7.2.12 Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα TOC

Ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) είναι το μέτρο της συνολικής ποσότητας άνθρακα που περιέχεται στις οργανικές ενώσεις, στο νερό και υδατικά διαλύματα. Ο TOC αποτελεί σημαντική παράμετρο για τον προσδιορισμό των οργανικών ενώσεων ενός δείγματος. Παρόλο που δεν υπάρχει κάποια άμεση ποσοτική συσχέτιση μεταξύ του ολικού οργανικού άνθρακα και της συνολικής συγκέντρωσης των οργανικών ενώσεων, ο TOC είναι ένας εύκολα μετρήσιμος γενικός δείκτης της οργανικής επιμόλυνσης που πολλές φορές χρησιμοποιείται για να παρακολουθηθεί η μεταβολή ή όχι του οργανικού περιεχομένου.

Για τον προσδιορισμό της επί της εκατό κατά όγκο περιεκτικότητας ολικού οργανικού άνθρακα TOC χρησιμοποιήθηκε η συσκευή TOC της εταιρείας Shimadzu.



Εικόνα 10: Συσκευή μέτρησης TOC.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στον υπολογισμό της ποσότητας διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται κατά την οξείδωση των ανθρακούχων ενώσεων που υπάρχουν στα διαλύματα δοκιμής. Τα δείγματα εισέρχονται στον σωλήνα καύσης της συσκευής και ο συνολικός άνθρακας που περιέχεται στο δείγμα οξειδώνεται στους 720°C προς σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται ένα φέρον αέριο το οποίο μεταφέρει τα προϊόντα της καύσης μαζί με το διοξείδιο του άνθρακα. Στην περίπτωση αυτής της συσκευής (SHIMADZU TOC-VCSH), ως αέριο-φορέας χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρός αέρας. Με τη βοήθεια του υπερκάθαρου αέρα, τα προϊόντα της καύσης μεταφέρονται σε έναν αφυγραντήρα προκειμένου να απομακρυνθεί η υγρασία, ενώ ταυτόχρονα ψύχονται όλα τα αέρια που παράγονται κατά την αρχική καύση. Στη συνέχεια, το φέρον αέριο διέρχεται από παγίδα αλογόνου και καταλήγει στην κυψέλη NDIR (αναλυτής αερίων μη διασκορπιστικού υπέρυθρου), όπου ανιχνεύεται το διοξείδιο του άνθρακα. Αξίζει να σημειωθεί ότι με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω μετράται ο συνολικός άνθρακας που υπάρχει στα δείγματα, οργανικός και ανόργανος. Ο ανόργανος άνθρακας βρίσκεται υπό μορφή διοξειδίου του άνθρακα και δεν είναι συνδεδεμένος με οργανικές ενώσεις. Επομένως, όταν απαιτείται η μέτρηση του ανόργανου άνθρακα (IC), τότε το όργανο αφαιρεί αυτόματα τον IC από τον ολικό άνθρακα (TC) και έτσι υπολογίζει τον οργανικό άνθρακα που υπήρχε αρχικά στο δείγμα.

7.2.13 Αναλυτική τακτική Van Soest

Η μέθοδος Van Soest αρχικά αναπτύχθηκε για τις χονδροειδείς ζωοτροφές, ωστόσο τροποποιήθηκε με την προσθήκη πρωτεολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων στη διαδικασία, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές.

Σκοπός της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ο προσδιορισμός κλασμάτων των συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων, τα οποία είναι κατά το δυνατόν απαλλαγμένα από άλλα συστατικά των ζωοτροφών (π.χ. πρωτεΐνες), απομακρύνοντας με κατάλληλα διαλύματα το κυτταρικό περιεχόμενο.

Τα τρία κλάσματα που προσδιορίζονται και αφορούν πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων είναι:

- Το NDF (Neutral Detergent Fiber) που περιλαμβάνει τη λιγνίνη, την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη και προκύπτει μετά τον βρασμό του δείγματος σε διάλυμα ουδέτερης αντίδρασης NDS (Neutral Detergent Solvent).

- Το ADF (Acid Detergent Fiber) που προκύπτει μετά από βρασμό του δείγματος σε διάλυμα όξινης αντίδρασης ADS (Acid Detergent Solvent) για την απομάκρυνση των ημικυτταρινών, οι οποίες είναι διαλυτές σε ασθενή οξέα. Επομένως, το ADF περιλαμβάνει την λιγνίνη και την κυτταρίνη.
- Το ADL (Acid Detergent Lignin) που περιλαμβάνει τη λιγνίνη και προκύπτει μετά από διαλυτοποίηση της κυτταρίνης με χρήση πυκνού διαλύματος 72% H₂SO₄.

Υπολογίζοντας τις διαφορές (NDF-ADF) και (ADF-ADL) προκύπτουν οι ημικυτταρίνες και η κυτταρίνη, αντίστοιχα, που περιέχονται στην εκάστοτε ζωοτροφή που αναλύεται.

Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων οίκου KERN/ALS 120-4
- Εργαστηριακός κλίβανος ξήρασης ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
- Ξηραντήρας με πλάκα πορσελάνης κάτω από την οποία τοποθετείται ξηραντικό μέσο (CaCl₂ ή gel σιλικόνης)
- Φιάλες ορού μέτρησης BMP (250mL)
- Σακίδια-ηθμοί
- Συσκευή θερμοσυγκόλλησης σακιδίων
- Ποτήρια ζέσης, ογκομετρικές φιάλες και ογκομετρικοί κύλινδροι διαφόρων όγκων

Χημικά αντιδραστήρια

- Καθαρή ακετόνη
- Διάλυμα ουδέτερης αντίδρασης (NDS)
30 g δωδεκακυλθειικού νατρίου, 18.61 g ένυδρου αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού νατρίου, 6.81 g ένυδρου τετραβορικού νατρίου (Na₂B₄O₇·10 H₂O), 4.56 g άνυδρου όξινου φωσφορικού νατρίου (Na₂HPO₄) ή 5.72 g ένυδρου όξινου φωσφορικού νατρίου (Na₂HPO₄·H₂O) και 10 mL 2-αιθοξυ-αιθανόλης (τριαιθυλενογλυκόλη) σε 1000 mL απιονισμένου H₂O, εύρος pH 6.9-7.1)
- Διάλυμα όξινης αντίδρασης (ADS)
20 g κετυλ-τριμεθυλο-αμμωνίο-βρωμιδίου (CTAB) σε 1000 mL απιονισμένου διαλύματος 1 N H₂SO₄
- Διάλυμα 1 N H₂SO₄
27.89 mL διαλύματος 95% (w/w) H₂SO₄ σε 1000 mL απιονισμένο H₂O
- Διάλυμα 72% (w/w) H₂SO₄
652 mL (ή 1200 g) πυκνού (96-98%) H₂SO₄ σε 350 mL απιονισμένο H₂O

Διαδικασία διαδοχικής μεθόδου Van Soest

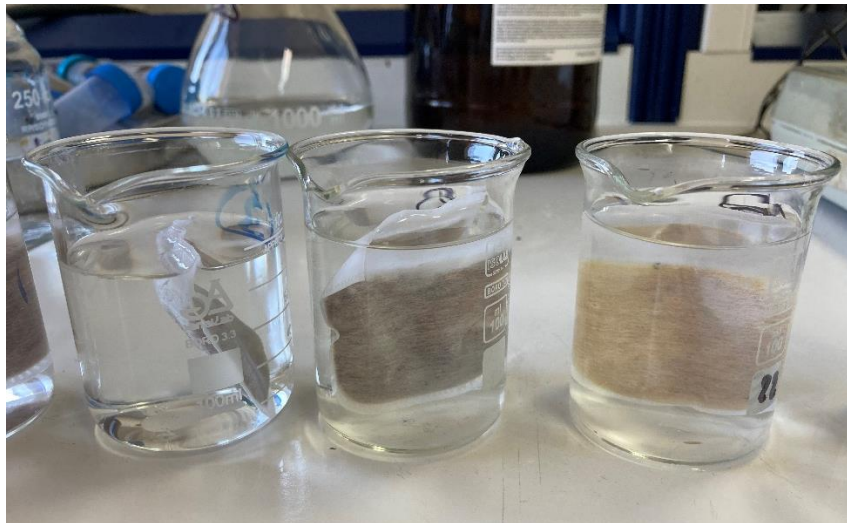
Αρχικά, ζυγίζονται τα σακίδια με ακρίβεια 0.1 mg, αφού προηγουμένως έχουν σημανθεί με ανεξίτηλο μαρκαδόρο. Τα σακίδια δεν χρειάζονται ξήραση.

Στη συνέχεια ζυγίζονται περίπου 0.5 g δείγματος με ακρίβεια 0.1 mg, απευθείας μέσα στα σακίδια. Τα σακίδια θερμοσυγκολλούνται (σφραγίζονται ανά ένα) στα 4 περίπου mm από την πάνω (ανοικτή) πλευρά και ζυγίζονται ξανά. Ακόμη, ζυγίζεται ένα άδειο σακίδιο (τυφλό δείγμα) για να ελεγχθεί η διαδικασία.

Τα κλειστά πλέον σακίδια με τα δείγματα τοποθετούνται σε φιάλες ορού μέτρησης BMP (250mL) και θερμαίνονται στους 100 °C σε 100 mL διαλύματος NDS. Η θέρμανση πραγματοποιείται σε κλίβανο αποστείρωσης ISOLAB Laborgerate GmbH Autoclave για 1 ώρα και 15 λεπτά.

Έπειτα, αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου για να είναι εύκολα διαχειρίσιμα, και στην συνέχεια τα δείγματα πλένονται με ζεστό απιονισμένο νερό έτσι ώστε να αφαιρεθεί όλο το διάλυμα NDS.

Κατά την διάρκεια των εκπλύσεων εφαρμόζεται μερική ανάδευση και πίεση στα σακίδια με λαβίδα. Απαιτούνται περίπου 10 εκπλύσεις.



Εικόνα 11: Στάδιο εκπλύσεων σακιδίων.

Τέλος, τα σακίδια εμβαπτίζονται σε ακετόνη εντός ποτηριού ζέσης των 250 mL για 10 λεπτά για αφαίρεση των λιπών. Αφού έχει εξατμιστεί η ακετόνη, ξηραίνονται στον αέρα σε φούρνο στους 105 °C για όλη τη νύχτα.

Μετά το πέρας της ξήρανσης τα σακίδια αφήνονται σε ξηραντήρα μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος διατηρώντας την ξηρή τους κατάσταση και καταγράφεται το μικτό βάρος με ακρίβεια 0.1 mg.

Ακολούθως, τα σακίδια τοποθετούνται ξανά στις φιάλες BMP και πραγματοποιείται η ίδια μεθοδολογία, απλά τώρα χρησιμοποιείται το διάλυμα ADS αντί του NDS.

Για τον προσδιορισμό της λιγνίνης τα σακίδια τοποθετούνται σε ποτήρια ζέσης 50-100mL και προστίθεται ποσότητα 72% H_2SO_4 μέχρι να καλύψει τα σακίδια (περίπου 20-30 mL H_2SO_4).

Προσοχή: τα σακίδια πρέπει να είναι τελείως στεγνά (διαφορετικά, το H_2SO_4 θα αντιδράσει έντονα με την υγρασία και (α) τα σακίδια θα μαυρίσουν, (β) λόγω της εξώθερμης αντίδρασης, μέρος της λιγνίνης μπορεί να διαλυτοποιηθεί δίνοντας λανθασμένα αποτελέσματα)

Μέσα στα ποτήρια ζέσεως τοποθετούνται μικρά βαρίδια, για να κρατάνε τα σακίδια βυθισμένα μέσα στο οξύ. Τα σακίδια πιέζονται με κατακόρυφες κινήσεις ανά 30 λεπτά για 3 ώρες. Μετά από 3 ώρες το οξύ αδειάζεται και τα σακίδια πλένονται με κρύο νερό μέχρις ότου απομακρυνθούν όλα τα ίχνη του οξέος. (οι εκπλύσεις σταματούν όταν ελεγχθεί το pH και βρεθεί περίπου 4 - 5)

Τα σακίδια βγαίνουν από το ποτήρι, πιέζονται ελαφρά για να απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα νερού και εμβαπτίζονται σε ακετόνη για 3 min. Στη συνέχεια, αφού έχει εξατμιστεί η ακετόνη, ξηραίνονται στον κλίβανο (105 °C) για όλη την νύχτα.

Τα σακίδια ψύχονται σε ξηραντήρα μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος και καταγράφεται το μικτό βάρος με ακρίβεια 0.1 mg.

Έπειτα τοποθετούνται σε προζυγισμένες κάψες, καταγράφεται το μικτό βάρος κάψας και σακιδίου και αποτεφρώνονται στους 550 ± 20 °C για 3-4 ώρες. Οι κάψες ψύχονται σε ξηραντήρα μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος και καταγράφεται το μικτό βάρος με ακρίβεια 0,1 mg.

7.2.14 Χώνευση στερεών δειγμάτων με μικροκύματα

Η χώνευση στερεών δειγμάτων πρόκειται για τη διαδικασία χώνευσης με ισχυρά οξέα (νιτρικό οξύ) στην οποία υποβάλλονται τα στερεά δείγματα (στερεά απόβλητα, ιλύες, λάσπη, κόμποστ, έδαφος και συναφή υλικά) προκειμένου να διαλυτοποιηθεί πλήρως το στερεό και να παραχθούν διαλύματα για την μέτρηση των περιεχόμενων μετάλλων. Η μέθοδος αυτή δεν έχει σκοπό να επιτύχει συνολική αποσύνθεση του δείγματος. Οι τελικές συγκεντρώσεις της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να μην αντικατοπτρίζουν τη συνολική περιεκτικότητα του δείγματος. Το προϊόν χώνευσης είναι κατάλληλο για την ανάλυση μετάλλων: καδμίου (Cd), χρωμίου (Cr), χαλκού (Cu), μολύβδου (Pb), μαγγανίου (Mn), νικελίου (Ni) και ψευδαργύρου (Zn).

Αντιδραστήρια

- Νερό, αγωγιμότητας 18.2 ΜΩ·cm (συσσκευή Human Power I)
- Νιτρικό οξύ 65%, HNO₃, ρ = 1.41 g·ml⁻¹.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται πρέπει να πληρούν τις προϋποθέσεις καθαρότητας της ακόλουθης ανάλυσης. Λαμβάνεται μέριμνα τα οξέα που χρησιμοποιούνται να είναι τουλάχιστον “ProAnalysis”.

Εξοπλισμός

- Φούρνος μικροκυμάτων Milestone Start D με ATCCE 400 Temperature Sensor (controlled by an electronic board), και SK-10 Segmented rotor με 10 δοχεία για χώνευση. Ο ρότορας SK-10 περιλαμβάνει ένα τμήμα αναφοράς που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της θερμοκρασίας και 9 κανονικά τμήματα.



Εικόνα 12: Φούρνος μικροκυμάτων MilestoneStartD.

- Ζυγός ακριβείας τεσσάρων ψηφίων οίκου KERN / ALS 120-4. Οι οδηγίες χρήσης του καταγράφονται στην OE- 604B-2.
- Δοχεία χώνευσης TFM με χωρητικότητα 100 ml
- Γυάλινες ογκομετρικές φιάλες class A 25ml.

- Σιφώνια class A 10 ml.
- Σύστημα διήθησης υπό κενό.
- Φίλτρα μεμβράνης (mixed cellulose ester) διαμέτρου πόρων 0.45 μm και διαμέτρου 47 mm.
- Υδρόλουτρο Polyscience S/NG22884

Διαδικασία χώνευσης δείγματος

Προετοιμασία δείγματος

- Τοποθετούμε ένα τεφλόν δοχείο χώνευσης κατευθείαν στην πλάκα ζυγού (το βάρος του δοχείου είναι περίπου 110 g).
- Μηδενίζουμε το βάρος του δοχείου και άμεσα ζυγίζουμε 0.25 – 0.5 g ξηρού και κοσκινισμένου δείγματος, με ακρίβεια 0.001 g στο δοχείο (για να αποφευχθεί η μόλυνση προσπαθούμε να μειώσουμε όσο το δυνατόν περισσότερο τη μεταφορά του δείγματος). Για εδάφη, κόμποστ, ιζήματα, και λάσπες, συνήθως δεν χρησιμοποιούμε περισσότερο από 0.500 g. Σε περίπτωση, όμως, που η ανάλυση απαιτεί ανίχνευση μικρότερων συγκεντρώσεων μετάλλων επιχειρείται, σταδιακά, ζύγισμα μεγαλύτερου βάρους του δείγματος έως 1,000 g. Για τα δείγματα μολυσμένων εδαφών, χρησιμοποιούμε αρχικά όχι περισσότερο από 0.250 g.
- Στο δοχείο χώνευσης που περιέχει το δείγμα προστίθενται 10 ± 0.1 ml πυκνού νιτρικού οξέος στο χώρο απαγωγού με σιφώνιο τύπου A.
- Ανακινούμε ομαλά το δοχείο μέχρι να ομογενοποιηθούν τα δείγματα με το οξύ και τοποθετούμε το τεφλόν κάλυμμα στο δοχείο.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Οι αναλυτές πρέπει να φορούν προστατευτικά γάντια και η διαδικασία να πραγματοποιείται σε απαγωγό.

Χειρισμός του ρότορα SK-10

Ο ρότορας του φούρνου μικροκυμάτων είναι ένα σύστημα που αποτελείται από τα εξής μέρη:

- α. από την βάση του ρότορα η οποία είναι πάντα τοποθετημένη στον θάλαμο του φούρνου μικροκυμάτων
- β. από δέκα ξεχωριστά τμήματα, που κλειδώνουν στην βάση του ρότορα. Στα τμήματα αυτά τοποθετούνται τα τεφλόν δοχεία (με το καπάκι τους και την ασπίδα) που στο πάνω μέρος τους τοποθετούνται άλλα δύο εξαρτήματα ασφαλείας
- γ. από το κάλυμμα του ρότορα.

Εξαίρεση αποτελεί το τμήμα του ρότορα με τον αριθμό 1. Στο δοχείο αυτό, το οποίο ονομάζουμε δοχείο αναφοράς, συνδέεται εξάρτημα ελέγχου θερμοκρασίας.

- Τοποθετούμε το κλειστό τεφλόν δοχείο στην ασπίδα προστασίας HTC (σκούρο γκρί κύλινδροι)

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Οι επιφάνειες των τοίχων της ασπίδας προστασίας HTC, καθώς και το εξωτερικό τοίχωμα του τεφλόν δοχείου πρέπει να είναι στεγνές και καθαρές, αλλιώς είναι δυνατόν να συμβούν ζημιές.

- Τοποθετούμε στο πάνω μέρος του τεφλόν τα δύο εξαρτήματα ασφαλείας. Το πρώτο εξάρτημα είναι μία πλάκα προσαρμογής (γκρί σκούρο) με το επίπεδο μέρος της στραμμένο προς τα κάτω ώστε να έχει το χώρο για το δεύτερο εξάρτημα ασφαλείας το λεγόμενο ελατήριο με το κυρτό μέρος προς τα πάνω (μπεζ).
- Κάθε τέτοιο δοχείο με την παραπάνω συνδεσμολογία τοποθετείται στα δέκα ξεχωριστά τμήματα πολυπροπυλενίου (λευκό τμήμα/βάση κλειδώματος) και σφραγίζεται με τον μοχλό μέχρι τον χαρακτηριστικό ήχο κλειδώματος.
- Κάθε σφραγισμένο πλέον τμήμα τοποθετείται πάνω στην βάση του ρότορα που βρίσκεται στο εσωτερικό του θαλάμου μικροκυμάτων. Το δοχείο αναφοράς τοποθετείται στο τέλος.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ποτέ δεν τοποθετούμε blank διάλυμα στη θέση αναφοράς.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Κατά την τοποθέτηση του καλύμματος αναφοράς, προσέχουμε το κάλυμμα να τοποθετηθεί σωστά ώστε να μπορεί να τοποθετηθεί αργότερα σωστά η ράβδος βύθισης. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ραγισμένοι ράβδοι βύθισης.

- Στον θάλαμο του φούρνου μικροκυμάτων, στην πάνω αριστερή πλευρά αποσυνδέουμε το κάλυμμα από την υποδοχή του βύσματος του αισθητήρα θερμοκρασίας και αμέσως συνδέουμε το καλώδιο του αισθητήρα θερμοκρασίας με το τμήμα του ρότορα 1 στο οποίο υπάρχει κατάλληλη υποδοχή.
- Τέλος αφού τοποθετηθεί και το τμήμα του ρότορα 1 με τον αισθητήρα θερμοκρασίας τοποθετούμε το κάλυμμα του ρότορα (λευκός δίσκος) προσέχοντας να κλειδώσει σωστά.
- Κλείνουμε την πόρτα του φούρνου και αρχίζουμε το πρόγραμμα της χώνευσης.

Ρυθμίσεις για την έναρξη την χώνευσης από την οθόνη ελέγχου ελέγχου TERMINAL 260

- Ελέγχουμε την σύνδεση των καλωδίων της μονάδας χώνευσης με την οθόνη ελέγχου TERMINAL 260 (με το λογισμικό easy CONTROL). Όταν συνδέουμε ή αποσυνδέουμε το TERMINAL 260 από την μονάδα, η μονάδα χώνευσης πρέπει να είναι κλειστή να μην προκαλέσουμε ζημιά στην πλάκα επαφής.
- Ανοίγουμε την συσκευή της χώνευσης - πατάμε το "ON" (με την ενεργοποίηση της συσκευής μικροκυμάτων θα ξεκινήσει την ίδια στιγμή το TERMINAL 260 και το πρόγραμμα)
- Εισάγουμε τον κωδικό του διαχειριστή (123456) ή του απλού χρήστη (123) στο TERMINAL 260 και πατάμε «OK». Στην οθόνη εμφανίζεται η επιφάνεια εργασίας του EasyControl
- Για να φτιάξουμε το πρόγραμμα χώνευσης πατάμε το "Program" και στην οθόνη θα δείξει "Method". Πατάμε "Parameter" και στην συνέχεια επιλεγούμε QP σε "50" για μεσαία ευαισθησία και μετά "QPCheck"
- Επιλέγουμε το παράθυρο "Ventilation", στο οποίο μπορούμε να δηλώσουμε που θέλουμε να γίνεται έλεγχος από το σύστημα, δηλαδή στην θερμοκρασία ή στην πίεση. Εισάγουμε "30" (30 min Ventilation) και πατάμε OK.
Επιλεγούμε Twist για τον αισθητήρα θερμοκρασίας T1 και Start parameters πάντα ενεργοποιημένο για τον αισθητήρα T1.

- Επιλεγούμε το παράθυρο “Wave” και απεικονίζεται το πρόγραμμα μικροκυμάτων. Εισάγουμε τις επιθυμητές παραμέτρους για το χρόνο και την ισχύ και πατάμε OK.

Οι παράμετροι για την μέθοδο της USEPA 3051A παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

No	t [hh.mm.ss]	E [W]	T1[°C]
1	00:15:00*	1000**	175
2	00:15:00	1000**	175

* αύξηση σε 10 λεπτά για περισσότερα από 5 δοχεία χώνευσης

** χρήση 500 Watt με 3 ή λιγότερα δοχεία χώνευσης

- Για να αποθηκεύσουμε το πρόγραμμα χώνευσης πατάμε το εικονίδιο “Floppydisk” και εμφανίζεται “Savefile”. Εισάγουμε το όνομα και πατάμε OK. Οι μέθοδοι αποθηκεύονται σε μορφή: όνομα.mpr

Έναρξη προγράμματος χώνευσης

- Πατάμε "Program" και στην οθόνη θα δείξει "Method". Πατάμε το εικονίδιο του φακέλου και στην συνέχεια επιλεγούμε στο “Loadfiles” το επιθυμητό πρόγραμμα.
- Επιλεγούμε "Wave" και στην οθόνη θα δείξει αντίστοιχο διάγραμμα. Πατάμε το “Run” και μετά το “Start”. Σε μερικά δευτερόλεπτα θα ξεκινήσει αυτόματα το πρόγραμμα χώνευσης.
- Στο τέλος πατάμε το “Floppydisk” και επιλεγούμε “Savefile”. Εισάγουμε το όνομα και πατάμε OK. Οι μέθοδοι αποθηκεύονται σε μορφή: όνομα.dpr

Ψύξη και αφαίρεση των δοχείων χώνευσης

- Όταν ο κύκλος θέρμανσης έχει ολοκληρωθεί, αφήνουμε τα δοχεία στην κοιλότητα μικροκυμάτων να κρυώσουν. Ρυθμίζουμε το χρόνο ψύξης (εξαερισμός) στο τερματικό του συστήματος. Μόλις φτάσει η θερμοκρασία κοντά σε θερμοκρασία δωματίου (μικρότερη των 60 °C), το δοχείο μπορεί να ανοίξει. Παίρνουμε το δυναμόκλειδο και βάζουμε τον δείκτη στην "ανοικτή" θέση.
- Τοποθετούμε το σταθμό εργασίας στον απαγωγό και προσεκτικά χαλαρώνουμε τη βίδα στο πάνω μέρος του κάθε τμήματος, χρησιμοποιώντας το δυναμόκλειδο.
- Ανοίγουμε τα δοχεία πολύ αργά, δεδομένου ότι μια ορισμένη πίεση μπορεί να εξακολουθεί να υπάρχει, ανάλογα με τον τύπο του δείγματος, ακόμη και αν η θερμοκρασία είναι τόσο χαμηλή όσο η θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαιρούμε το δοχείο από το τμήμα πολυπροπυλενίου.
- Τα TFM τεφλόν δοχεία στην συνέχεια τοποθετούνται σε υδρόλουτρο στους 100°C ± 1.1 για τουλάχιστον 2 ώρες, προκειμένου να απομακρυνθεί όσο το δυνατόν περισσότερο το νιτρικό οξύ.
- Εάν το χωνεμένο δείγμα περιέχει στερεό υπόλειμμα, το δείγμα πρέπει να διηθείται από φίλτρα 0,45 μm.

- Το δείγμα μεταγγίζεται σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml ή των 10 ml (για ανίχνευση μικρότερων συγκεντρώσεων μετάλλων) αραιώνεται μέχρι την χαραγή και είναι έτοιμο για την ανάλυση σε φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης.
- Τυφλό: Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία χωρίς δείγμα και γίνεται τουλάχιστον ένα τυφλό για κάθε σετ δειγμάτων (9 δείγματα).

Καθαρισμός σκευών χώνευσης

Όλα τα δοχεία χώνευσης και τα ογκομετρικά σκευή πρέπει να είναι προσεκτικά πλυμένα με οξέα και ξεπλυμένα με υπερκαθαρό νερό.

Μεταξύ των χωνεύσεων τα δοχεία χώνευσης TFM πρέπει να καθαρίζονται πρώτα με ζεστό (1:1) υδροχλωρικό οξύ (περίπου 80 °C) για τουλάχιστον δύο ώρες και μετά με ζεστό (1:1) νιτρικό οξύ (περίπου 80 °C) για τουλάχιστον δύο ώρες. Τα δοχεία θα πρέπει στη συνέχεια να ξεπλένονται με υπερκαθαρό νερό και να ξηραίνονται σε καθαρό περιβάλλον.

Τα γυάλινα ογκομετρικά σκευή και τα πλαστικά δοχεία αποθήκευσης δειγμάτων πρέπει να καθαρίζονται με έκπλυση με πιο αραιά οξέα (περίπου 10% V/V) και στη συνέχεια να ξεπλένονται με υπερκαθαρό νερό και να ξηραίνονται σε ένα καθαρό περιβάλλον.

7.2.15 Προσδιορισμός μετάλλων

Ο προσδιορισμός των μετάλλων χρωμίου (Cr), χαλκού (Cu), νικελίου (Ni), μαγγανίου (Mn), καδμίου (Cd), μολύβδου (Pb), ψευδαργύρου (Zn), στα στερεά χωνεμένα δείγματα (απόβλητα, ιλύες, λάσπη, κόμποστ, έδαφος και συγκρίσιμα υλικά) γίνεται με Φασματοφωτόμετρο Ατομικής Απορρόφησης με Φλόγα (FAAS) Agilent AA240FS.

Διαδικασία ανάλυσης

Φασματομέτρο Ατομικής Απορρόφησης με Φλόγα Agilent Technologies 200 Series AA, με διόρθωση υπόβαθρου με λάμπα δευτερίου. Περιφερειακά: φιάλη ακετυλενίου 99,6 % με μανόμετρο, αντλία αέρα που μεταφέρει αέρα στο σύστημα με μανόμετρο και παγίδα υγρασίας (AAS-1).

Άνοιγμα οργάνου

Πριν την ανάλυση πάντα ελέγχουμε τις φιάλες αερίων. Η πίεση στο μανόμετρο του αέρα πρέπει να είναι ρυθμισμένη στα 50 και η πίεση στο μανόμετρο ρύθμισης ακετυλενίου 1 bar. Κατώτερο όριο πίεσης στο μανόμετρο της φιάλης ακετυλενίου: 5 bar.

ΠΡΟΣΟΧΗ! Όταν το ακετυλένιο φτάσει στην περιοχή μεταξύ 10 και 5 bar δεν πρέπει να χρησιμοποιείται άλλο η φιάλη και πρέπει να αντικαθίσταται. Υπάρχει κίνδυνος να περάσει ακετυλένιο από την φιάλη στο σύστημα και να προκαλέσει βλάβες σε σημεία του μηχανήματος και αναφλέξεις.

- Ανοίγουμε το μηχάνημα "Power On" (διακόπτης μπροστά αριστερά στο FAAS)
- Ανοίγουμε τον υπολογιστή
- Ανοίγουμε τον απαγωγό (κόκκινο μπουτόν στον πάγκο εργασίας).
- Άνοιγμα αντλίας του αέρα.
- Ανοίγουμε τη φιάλη του ακετυλενίου.

Χειρισμός λογισμικού

Στην οθόνη του υπολογιστή ανοίγουμε την εφαρμογή SpectrAA. Ανοίγει το παράθυρο διαλόγου του λογισμικού του μηχανήματος (Main Index Window) με 4 ενδείξεις: Worksheet, Reports, Administration και Exit.

Στη σελίδα επιλέγουμε Worksheet - "New from". Από τη λίστα που εμφανίζεται επιλέγουμε διαδοχικά τους φακέλους: katerina→ISO_17025→ και στην συνέχεια επιλέγουμε τον φάκελο με την πιο πρόσφατη ημερομηνία, ώστε στην συνέχεια να επιλέξουμε την μέθοδο με την ονομασία "ISO ημ_μην_ετ".

Κάθε Worksheet αποτελείται από 4 φύλλα: Filling Page , Develop, Labels και Analysis.

Στο φύλλο Filling Page ανοίγουμε, κλείνουμε και αποθηκεύουμε Worksheets ή φτιάχνουμε νέες μεθόδους.

Στο φύλλο Develop φαίνονται τα προσδιοριζόμενα μέταλλα της μεθόδου (Cr, Cu, Ni, Mn, Cd, Pb, Zn). Επιλέγουμε επίσης την διαδικασία "Fast sequential wizard" ώστε η ανάλυση να γίνεται σε οριζόντια διάταξη (ανά δείγμα) και πριν τερματίσουμε την διαδικασία ελέγχουμε να είναι επιλεγμένο το calibration.

Στην σελίδα Labels καταγράφουμε είτε με αρίθμηση είτε ονομαστικά τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν. Η σειρά καταγραφής των δειγμάτων γίνεται με τον εξής τρόπο:

- Αρχικά καταγράφουμε τα QC διαλύματα (1, 2, 3, 4) για τον έλεγχο της καμπύλης
- Το τυφλό της χώνευσης
- Τα άγνωστα δείγματα

Στη σελίδα Analysis ελέγχουμε και πραγματοποιούμε την ανάλυση.

Επίσης στο φύλλο αυτό, γίνεται ευθυγράμμιση του καυστήρα, των λυχνιών (μόνο αν απαιτούνται) και του σήματος. Με την επιλογή "Optimize" , εμφανίζεται σε ένα παράθυρο η λίστα των μετάλλων της υπάρχουσας μεθόδου, γίνεται επιλογή ενός από αυτά και στην συνέχεια ανοίγει ένα παράθυρο εργασίας όπου ρυθμίζουμε το σύστημα, με ρύθμιση των παραπάνω (καυστήρας, λυχνίες και σήμα) ώστε να έχουμε την μέγιστη απορρόφηση του συγκεκριμένου μετάλλου.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η διαδικασία αυτή δεν είναι ανάγκη να γίνεται σε κάθε ανάλυση και για όλα τα μέταλλα ξεχωριστά, αρκεί να γίνει σε ένα.

Ευθυγράμμιση καυστήρα: Στο ήδη υπάρχον παράθυρο αναμένουμε να εμφανιστεί η απορρόφηση του συστήματος, έχοντας στο nebulizer το Blank διάλυμα. Αφού εμφανιστεί η απορρόφηση ρυθμίζουμε τον καυστήρα δεξιά-αριστερά και πάνω-κάτω αναμένοντας την μέγιστη απορρόφηση.

Ευθυγράμμιση λυχνιών: Στο ήδη υπάρχον παράθυρο πατάμε optimize lamps. Αναμένουμε να εμφανιστεί η απορρόφηση του συστήματος. Η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει και χωρίς φλόγα. Όταν εμφανιστεί η απορρόφηση ρυθμίζουμε τις λυχνίες δεξιά-αριστερά πετυχαίνοντας την μέγιστη απορρόφηση περίπου στο 1. Σε περίπτωση που η απορρόφηση είναι πιο κάτω από ένα πατάμε *rescale*.

Ρύθμιση σήματος: Στο ήδη υπάρχον παράθυρο αναμένουμε να εμφανιστεί η απορρόφηση του συστήματος, έχοντας στο nebulizer Blank δ/μα. Αφού εμφανιστεί η απορρόφηση πατάμε Insert Zero ώστε η απορρόφηση να μηδενιστεί. Στην συνέχεια πατάμε την εντολή optimize Signal βάζοντας στο nebulizer το πιο πυκνό πρότυπο διάλυμα που έχει παρασκευαστεί για την καμπύλη βαθμονόμησης και αναμένουμε την επιθυμητή απορρόφηση σύμφωνα με το software του οργάνου. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία 2-3 φορές. Αν η απορρόφηση είναι η αναμενόμενη τότε το σύστημα είναι έτοιμο για περαιτέρω αναλύσεις.

Έναρξη ανάλυσης

Ανάβουμε τη φλόγα και αφήνουμε το σύστημα 5 λεπτά να ισορροπήσει. Πατάμε “Start”. Για τη βαθμονόμηση ζητείται από το σύστημα το τυφλό διάλυμα CAL ZERO και στην συνέχεια ζητούνται τα πρότυπα διαλύματα με την σειρά από το αραιότερο προς το πυκνότερο για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης των μετάλλων που προσδιορίζουμε. Η καμπύλη βαθμονόμησης είναι συνήθως γραμμική καμπύλη παλινδρόμησης (linear) της συγκέντρωσης με την απορρόφηση της μορφής $Abs = a \cdot C + b$, όπου a είναι η κλίση της καμπύλης. Ο συντελεστής συσχέτισης της καμπύλης βαθμονόμησης r πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 0,9900 προκειμένου η καμπύλη να είναι αποδεκτή. Η κλίση a και η τεταγμένη b να είναι εντός των αποδεκτών ορίων (βλ. αρχείο excel «όρια αποδοχής καμπύλης»)

Αφού κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης γίνεται και έλεγχος της μεθόδου με το διάλυμα που έχει προπαρασκευαστεί (αναφέρεται παραπάνω - QC) για τυχόν ολίσθηση της καμπύλης βαθμονόμησης.

Μετά και τον έλεγχο της καμπύλης, ξεκινά η ανάλυση των δειγμάτων. Χρησιμοποιούνται οι ίδιες συνθήκες λειτουργίας με εκείνες της βαθμονόμησης. Πρώτα αναλύεται το τυφλό δείγμα της διαδικασίας χώνευσης, έπειτα τα δείγματα και στο τέλος τα διαλύματα ελέγχου ποιότητας.

Συμπληρώνεται από τον αναλυτή για κάθε σειρά δειγμάτων, τυφλού και ενός διαλύματος ελέγχου ποιότητας στο τετράδιο του οργάνου (43 AAS) όπου καταγράφονται στα αντίστοιχα πεδία: η ημερομηνία μέτρησης, το μέταλλο που αναλύεται, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, οι συγκεντρώσεις των προτύπων βαθμονόμησης (προαιρετικά οι απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων, ο συντελεστής συσχέτισης της καμπύλης βαθμονόμησης). Στα πεδία που αφορούν τα δείγματα καταγράφονται ο κωδικός δείγματος, η αραιώση που τυχόν έχει γίνει σε περίπτωση που το δείγμα υπερβαίνει τις συγκεντρώσεις των προτύπων βαθμονόμησης και η περιγραφή του δείγματος. Επιπλέον καταγράφονται τα αποτελέσματα μέτρησης του διαλύματος ελέγχου στις παρατηρήσεις του φύλλου εργασίας και σημειώνεται η ημερομηνία χώνευσης εφόσον έχει γίνει.

Κλείσιμο οργάνου

Στο τέλος των αναλύσεων κάνουμε εκτόνωση στην φιάλη ακετυλενίου με τον εξής τρόπο: Έχοντας ένα Worksheet ανοιχτό ανάβουμε την φλόγα, έχοντας το σωλήνα προσρόφησης του δείγματος μέσα στο διάλυμα CAL ZERO. Στην συνέχεια κλείνουμε την φιάλη ακετυλενίου οπότε ταυτόχρονα η φλόγα σβήνει λόγω της μη παροχής του αερίου.

(Λόγο καλής συντήρησης του εκνεφωτή καλό είναι να αφήνουμε την φλόγα αναμμένη 10-15 λεπτά με το σωλήνα προσρόφησης του δείγματος μέσα στο διάλυμα 5% νιτρικού οξέος σε υπερκαθαρό νερό πριν κλείσουμε την φιάλη ακετυλενίου).

Για να κάνουμε λήψη των αποτελεσμάτων κάνουμε εξαγωγή από τη σελίδα “Reports” και τα αποθηκεύουμε όπως και την μέθοδο στον υπολογιστή στο φάκελο DATA με τον παρακάτω τρόπο:
c:\Varian\sr100\DATA\όνομα αναλυτή\ISO 17025\ημερομηνία

Στο τέλος κλείνουμε το πρόγραμμα, τον υπολογιστή, το κομπρεσέρ, τον απαγωγό και το μηχάνημα ατομικής απορρόφησης πάντα τελευταίο.

Εφόσον έχει καταχωρηθεί από πριν η μάζα κάθε δείγματος και έχει υπολογιστεί η ξηρή μάζα από την υγρασία του δείγματος, υπολογίζεται η συγκέντρωση του μετάλλου στο δείγμα σε mg/kg:

$$C \left(\frac{mg}{kg} \right) = \frac{(C_{AAS} - C_{\text{τυφλό}}) \cdot V_{\text{χων}} \cdot A}{m \cdot \Xi \cdot B}$$

Όπου:

C η τελική συγκέντρωση του μετάλλου στο δείγμα (mg/kg)

C_{AAS} η συγκέντρωση του μετάλλου στο χωνεμένο δείγμα (mg/L)

C_{τυφλό} η συγκέντρωση του τυφλού της διαδικασίας χώνευσης (mg/L)

V_{χων} ο τελικός όγκος χωνεμένου δείγματος (L)

A ο συντελεστής αραίωσης

M η αρχική μάζα δείγματος (g)

Ξ·B. το κλάσμα της ξηρής προς αρχική μάζα (g/g)

Στο αποτέλεσμα που έχει υπολογισθεί σε mg/kg πολλαπλασιάζουμε με την τυχόν αραίωση που έχει υποστεί το δείγμα.

Στην περίπτωση δειγμάτων για τα οποία η απορρόφηση είναι αρνητική, στα αποτελέσματα αναφέρεται ότι η συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου μετάλλου είναι μικρότερη του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού.

7.2.16 Προσδιορισμός ορθο-φωσφορικών

Ο προσδιορισμός των ορθο-φωσφορικών γίνεται σε φωτόμετρο Spectroquant UV/VIS Pharo 300 σε χωνεμένα δείγματα, χρησιμοποιώντας το κιτ Phosphate Test της εταιρείας Merck.

Αρχικά, γίνεται έλεγχος του pH του δείγματος, το οποίο πρέπει να είναι 0 – 10. Εάν χρειάζεται διόρθωση, προστίθεται αραιό υδροξείδιο του νατρίου ή θειικό οξύ σταγόνα-σταγόνα.

Στη συνέχεια, προστίθενται 5 mL του δείγματος σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα και εισάγονται 5 σταγόνες του αντιδραστήριου P-1. Γίνεται καλή ανάδευση και έπειτα προστίθεται 1 κοφτό μπλε μικρό κουταλάκι του αντιδραστήριου P-2. Ο δοκιμαστικός σωλήνας ανακινείται δυνατά μέχρι να διαλυθεί το στερεό αντιδραστήριο και αφήνεται για 5 λεπτά.

Αφού περάσουν τα 5 λεπτά το διάλυμα μεταφέρεται σε κυψελίδα, επιλέγεται στο φωτόμετρο η κατάλληλη μέθοδος με τον AutoSelector και τοποθετείται η κυψελίδα στον υποδοχέα των κυψελίδων.

7.3 Βιοδιεργασίες

7.3.1 Ενζυμική υδρόλυση

Ενζυμική υδρόλυση είναι η διαδικασία κατά την οποία προστίθενται ένζυμα για την υδρόλυση βιομαζών σε ζυμώσιμα σάκχαρα.⁵⁶ Ουσιαστικά, κατά την ενζυμική υδρόλυση τα ένζυμα προσκολλώνται στις επιφάνειες των αντίστοιχων υποστρωμάτων (πχ. κυτταρίνη στην κυτταρίνη) μέσω της υδατικής φάσης και προσροφώνται από αυτά. Στη συνέχεια, σχηματίζονται σύμπλοκα ενζύμου-υποστρώματος και πραγματοποιείται υδρόλυση και μεταφορά των προϊόντων της από την επιφάνεια των υποστρωμάτων στην υδατική φάση. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιούνται πηκτινάσες και κυτταρινάσες.

Κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων ενζυμικής υδρόλυσης ποσότητα νωπής πρώτης ύλης (τροφοδοσία 1) προστίθεται σε γυάλινη φιάλη των 500 mL μαζί με την κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού ανάλογα με το φορτίο στερεών που πρέπει να επιτευχθεί. Αφού, γίνει καλή ανάδευση μετράται το pH και διορθώνεται με CaCO₃ μέχρι τελικό pH περίπου 5 - 5.5.

Έπειτα, βάσει υπολογισμών προστίθενται κατάλληλες ποσότητες από τα κυτταρινολυτικά και πηκτινικά ένζυμα Pectinex και CellicTec3 της εταιρείας Novozymes. Τα μπουκάλια κλείνονται και τοποθετούνται στην συσκευή ανάδευσης (Constant Temperature Shaking Incubator FS-70B), η οποία ρυθμίζεται στους 50 °C και στις 150 rpm. Η σακχαροποίηση διαρκεί 24 ώρες.

Μετά το πέρας των 24 ωρών πραγματοποιείται φυγοκέντρηση και διήθηση του διαλύματος κατά την οποία συλλέγεται η στερεή και η υγρή φάση. Η στερεή φάση τοποθετείται σε ποτήρια ζέσεως και ξηραίνεται στους 50 °C για δύο μέρες. Στη συνέχεια, ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της.

Στην υγρή φάση μετρούνται η γλυκόζη, ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) και τα αναγωγικά σάκχαρα (TRS).

Η απόδοση της σακχαροποίησης S_G αποτελεί το μέτρο της αποτελεσματικότητας της ενζυμικής υδρόλυσης. Εκφράζεται από την σχέση:

$$S_G = \frac{\text{Παραγόμενη γλυκόζη}}{\text{Θεωρητικά παραγόμενη γλυκόζη}} \cdot 100\% \quad 7.1$$

Η απόδοση των σακχάρων εκφράζεται ως η παραγόμενη μάζα της γλυκόζης ανά 100 g ολικών στερεών (g glucose/100 g TS).

7.3.2 Αερόβια ζύμωση

Η αερόβια ζύμωση ή αερόβια γλυκόλυση είναι μια μεταβολική διαδικασία με την οποία τα κύτταρα μεταβολίζουν τα σάκχαρα μέσω ζύμωσης παρουσία οξυγόνου και συμβαίνει μέσω της καταστολής του φυσιολογικού αναπνευστικού μεταβολισμού.⁵⁷ Η αερόβια ζύμωση είναι συνήθως συντομότερη και πιο έντονη από την αναερόβια ζύμωση. Το διαλυμένο οξυγόνο (DO) πρέπει να διατηρείται γενικά σε όσο το δυνατόν υψηλότερη συγκέντρωση. Αυτό επιτυγχάνεται με έντονη ανάδευση και αερισμό καθώς έτσι οι φυσαλίδες που μεταφέρουν το οξυγόνο διασπείρονται ευκολότερα παραμένουν για μεγαλύτερο χρόνο στο υγρό. Επίσης, η ανάδευση διασφαλίζει και ομοιογένεια του διαλύματος.⁵⁸

Κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων της αερόβιας χρησιμοποιείται το υδρόλυμα που έχει προκύψει από τα πειράματα της ενζυμικής υδρόλυσης. Έτσι, σε φιάλες των 500 mL εισάγονται 100 mL υδρολύματος με συγκέντρωση γλυκόζης περίπου ίση με 5 g/L, η οποία μετράται στο φωτόμετρο.

Στη συνέχεια, μετράται το αρχικό pH και με βάση το ποιο πείραμα του παραγοντικού κύκλου πραγματοποιείται, αυτό διορθώνεται περίπου έως 4.5 – 5.0 ή όχι. Στη συνέχεια, προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες των θρεπτικών MgSO₄, (NH₄)₂SO₄ και KH₂PO₄.

Ο *S. cerevisiae* μπορεί να αναπτυχθεί αερόβια όμως απαιτούνται πηγές αζώτου, θείου και μετάλλων για την βέλτιστη ανάπτυξη της μαγιάς. Με βάση τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα⁵⁵, οι ποσότητες που είναι απαραίτητες για ποσότητα διαλύματος 100ml παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Ποσότητες θρεπτικών ενώσεων για την καλλιέργεια μαγιάς.

Θρεπτικά	m (g)
MgSO ₄	0.04
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2
KH ₂ PO ₄	0.5

Σύμφωνα με την τελική συγκέντρωση του διαλύματος σε γλυκόζη που έχει μετρηθεί υπολογίζεται η ποσότητα της ξηρής μαγιάς για το εκάστοτε πείραμα και προστίθεται στις φιάλες.

Σε κάθε φιάλη εισάγεται ένας μαγνήτης και αερισμός μέσω αντλιών και τοποθετούνται πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα. Η ανάδευση διαρκεί 24 ώρες.



Εικόνα 13: Πειραματική διάταξη αερόβιας ζύμωσης.

Μετά το πέρας των 24 ωρών τα διαλύματα διηθούνται. Συλλέγεται η υγρή φάση για να μετρηθεί η γλυκόζη και η αιθανόλη στο φωτόμετρο, και η στερεή φάση για να ξηραθεί στους 50 °C για δύο μέρες και να προσδιοριστεί η παραγόμενη μαγιά.

Η απόδοση της διαδικασίας της αερόβιας ζύμωσης Y_{aer} που αποτελεί ένα μέτρο της παραγωγής μαγιάς, εκφράζεται από τη σχέση:

$$Y_{aer} = \frac{\text{Παραγόμενη μαγιά} \left(\frac{g}{g}\right)}{TRS} \quad 7.2$$

7.4 Πειραματικές διατάξεις

7.4.1 Πειραματική διάταξη μεσαίας κλίμακας

Η πειραματική διάταξη μεσαίας κλίμακας απαρτίζεται από 2 αντιδραστήρες διαλείποντος έργου (batch reactors), ενωμένους σε σειρά, με αναδευτήρα και ένα σύστημα θέρμανσης με ανακυκλοφορία ρεύματος θερμού νερού. Η απαιτούμενη τάση για τη θέρμανση του αντιδραστήρα και ανάδευση του περιεχομένου παρέχεται μέσω ηλεκτρικού κυκλώματος. Η πειραματική διάταξη φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 14.



Εικόνα 14: Πειραματική διάταξη μεσαίας κλίμακας.

Στην πειραματική διάταξη μεσαίας κλίμακας, ο κάθε αντιδραστήρας είναι ένα κυλινδρικό δοχείο όγκου 5 λίτρων. Τόσο το δοχείο όσο και το καπάκι του είναι κατασκευασμένα από ανοξείδωτο ατσάλι. Ο αντιδραστήρας αποτελεί δοχείο διπλού τοιχώματος, μεταξύ των οποίων ανακυκλοφορεί ρεύμα νερού που μπορεί να προσαρμόσει την θερμοκρασία στο εσωτερικό αναλόγως με την απαίτηση (ρύθμιση) που υπάρχει. Για τη διεργασία αυτή, υπάρχουν 2 ακροφύσια στο πλαϊνό εξωτερικό τοίχωμα του δοχείου, το ένα στο πάνω και το άλλο στο κάτω μέρος. Στο κέντρο της κάτω βάσης του αντιδραστήρα υπάρχει ένα ακόμη ακροφύσιο από το οποίο συλλέγονται τα προϊόντα υγρής φάσης μετά την λήξη ενός κύκλου αντίδρασης. Το καπάκι του αντιδραστήρα διαθέτει ακόμη 2 ακροφύσια. Το ένα ακροφύσιο, το οποίο βρίσκεται στο κέντρο της βάσης, το διαπερνά ο αναδευτήρας, ενώ στο δεύτερο διέρχεται το θερμοστοιχείο που καταγράφει την θερμοκρασία αντίδρασης.

Το σύστημα θέρμανσης που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει ένα μεγάλο κυλινδρικό δοχείο το οποίο γεμίζεται με νερό, έναν ρυθμιστή θερμοκρασίας και μια ηλεκτρική αντλία νερού. Το δοχείο (boiler) αποτελείται από διάφορους αντιστάτες στους οποίους διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα και αυτοί με την σειρά τους παράγουν θερμότητα και την μεταφέρουν στο νερό. Με την βοήθεια του ρυθμιστή θερμοκρασίας, ο οποίος βρίσκεται ενσωματωμένος στο επάνω μέρος του boiler, είναι δυνατή η επιλογή της επιθυμητής θερμοκρασίας. Παράλληλα, η ηλεκτρική αντλία νερού, με την οποία είναι εξοπλισμένο το δοχείο νερού, είναι υπεύθυνη για την ανακυκλοφορία του

θερμού νερού στο εξωτερικό τοίχωμα του αντιδραστήρα. Για το λόγο αυτό, στο επάνω μέρος του boiler υπάρχουν 2 ακροφύσια, τα οποία είναι συνδεδεμένα, με χρήση εργαστηριακών σωλήνων σιλικόνης, με τα 2 ακροφύσια που βρίσκονται στην εξωτερική πλαϊνή επιφάνεια του αντιδραστήρα, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Από το ένα ακροφύσιο του boiler εξέρχεται το θερμό ρεύμα νερού με κατεύθυνση προς το κέλυφος του αντιδραστήρα, ενώ στην άλλη οπή εισέρχεται το ρεύμα νερού που έχει περάσει από τα τοιχώματα του αντιδραστήρα και έχει αφήσει μέρος του θερμικού περιεχομένου του.

7.4.2 Πιλοτική μονάδα βιομετατροπής

Η πιλοτική μονάδα είναι μια προϋπάρχουσα εγκατάσταση που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο του έργου LIFE WASTE2BIO (LIFE11 ENV/GR/000949), η οποία αναβαθμίστηκε στο πλαίσιο του προγράμματος Horizon 2020 WaysTUP! Project (GA no. 818308). Αυτή η πρωτότυπη εγκατάσταση χρησιμοποιήθηκε για την κάλυψη των αναγκών της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας. Η πιλοτική μονάδα περιλαμβάνει τα εξής:

- α) 2 διασυνδεδεμένους βιοαντιδραστήρες (για ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση)
- β) μια μονάδα απόσταξης (ανάκτηση διαλυτών).

Βιοαντιδραστήρες και μονάδα απόσταξης

Η μονάδα βιομετατροπής αποτελείται από δύο διασυνδεδεμένους οριζόντιους κυλινδρικούς βιοαντιδραστήρες των 200 L, με περιστρεφόμενο άξονα για την ανάμειξη του υλικού. Η θερμοκρασία ελέγχεται από διπλά τοιχώματα στα οποία κυκλοφορεί θερμό νερό. Κάθε βιοαντιδραστήρας έχει ανεξάρτητο κύκλωμα θέρμανσης, όπου η θερμοκρασία του μείγματος της αντίδρασης ρυθμίζεται και ελέγχεται μέσω του PLC.



Εικόνα 15: Οι δύο βιοαντιδραστήρες της πιλοτικής μονάδας.

Στον κεντρικό πίνακα υπάρχουν 4 ψηφιακές ενδείξεις θερμοκρασίας. Ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να ρυθμίσει τόσο τη θερμοκρασία της αντίδρασης όσο και τη θερμοκρασία του νερού ανακυκλοφορίας.



Εικόνα 16: Βασικά μέρη συστήματος θέρμανσης.

Το pH παρακολουθείται και ελέγχεται, μέσω ενός πλήρως αυτοματοποιημένου συστήματος που περιλαμβάνει ανιχνευτές pH, ψηφιακές ενδείξεις και ρυθμιστές και 4 περισταλτικές αντλίες για την προσθήκη των απαραίτητων χημικών ουσιών. Η λειτουργία της πιλοτικής μονάδας ελέγχεται πλήρως μέσω του αναβαθμισμένου PLC Siemens S7 – 1200.



Εικόνα 17: Ρυθμιστής pH.

Ο χειριστής της πιλοτικής μονάδας μπορεί να ρυθμίσει όλες τις λειτουργικές παραμέτρους (T, pH, χρόνος ανάδευσης και κατεύθυνση, συνολική διάρκεια) μέσω μιας οθόνης αφής 7'' (Siemens). Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ήδη αποθηκευμένα προγράμματα.



Εικόνα 18: Πίνακας ελέγχου πιλοτικής μονάδας.

Ακόμη, στο σύστημα υπάρχει και μονάδα απόσταξης που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην περίπτωση ανάκτησης αιθανόλης.

7.4.3 Πιλοτική μονάδα ξήρανσης

Ο ξηραντήρας Gaia (Σχήμα 6) είναι ένα σύστημα μείωσης του όγκου των οργανικών απορριμμάτων και υπολειμμάτων φαγητού σε ποσοστό που φτάνει μέχρι και το 90%. Γενικά, τα ξηραντήρια Gaia είναι απλά αυτόματα συστήματα ξήρανσης που στηρίζονται στη θέρμανση και τη μηχανική ανάδευση. Εξαιτίας του γεγονότος ότι τα ποσοστά υγρασίας στα οργανικά απορρίμματα και τα υπολείμματα φαγητού είναι πολύ υψηλά (70 – 80%), η μείωση του όγκου και του βάρους επιτυγχάνεται με την εξάτμιση του νερού. Τα ξηραντήρια Gaia διαφοροποιούνται από άλλες τεχνολογίες ξήρανσης λόγω του συστήματος κλειστού βρόχου (closed loop). Οι υδρατμοί που παράγονται από την θέρμανση αφού περάσουν από σύστημα δύο φίλτρων οδηγούνται προς συμπύκνωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην υπάρχουν εκπομπές και οσμές παρά μόνο νερό το οποίο και απομακρύνεται στο αποχετευτικό σύστημα, ενώ το τελικό προϊόν είναι άοσμη, ξηρή αποστειρωμένη βιομάζα που μπορεί να αποθηκευτεί για αρκετές εβδομάδες. Το σύστημα τροφοδοτείται με ηλεκτρική ενέργεια ενώ η θέρμανση είναι δυνατόν να προέρχεται από φυσικό αέριο, πετρέλαιο, ηλεκτρικό ρεύμα ή ακόμα και από ατμό. Οι χρόνοι κατεργασίας όπως επίσης και το κόστος χρήσης ποικίλουν και εξαρτώνται από τον τύπο των απορριμμάτων και την περιεκτικότητα αυτών σε υγρασία. Οι συνήθεις χρόνοι κατεργασίας κυμαίνονται από 7 έως 9 ώρες και η κατανάλωση ηλεκτρικής ενέργειας από 0.28 έως 9 kW/kg.

Πολύ σημαντικό λειτουργικό στοιχείο των ξηραντήρων Gaia είναι το γεγονός ότι είναι μοναδικά σε ανοχή συσκευασμένων απορριμμάτων. Κατά τη διάρκεια της ξήρανσης, οποιοδήποτε μη οργανικό (π.χ. πλαστικό ή αλουμίνιο) θρυμματίζεται επιτρέποντας στα οργανικά απορρίμματα να ξηραθούν, ενώ οι συσκευασίες παραμένουν διαθέσιμες για ανάκτηση μέσω μιας απλής μεθόδου διαλογής.

Το σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες της διπλωματικής αυτής εργασίας για την ξήρανση του συστατικού της ζωοτροφής.



Εικόνα 19: Ξηραντήρας GAIA GC - 100.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

8.1 Παραγοντικός σχεδιασμός πειραματικών δοκιμών

Όπως προαναφέρθηκε κύριος στόχος αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η παραγωγή ενός βελτιωμένου συστατικού ζωοτροφών για πρόβατα από φλούδες πορτοκαλιού που προέρχονται από βιομηχανίες χυμού πορτοκαλιού. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της σακχαροποίησης με ενζυμική υδρόλυση που στοχεύει στη μείωση της περιεκτικότητας σε πηκτίνη και ελεύθερα σάκχαρα. Το επόμενο βήμα είχε ως στόχο την αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού, ώστε να λαμβάνεται μια ισορροπημένη σε θρεπτικά συστατικά ζωοτροφή, η οποία πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το υδρόλυμα της σακχαροποίησης για την καλλιέργεια μαγιάς.

Ως μεθοδολογική προσέγγιση υιοθετήθηκε παραγοντικός πειραματικός σχεδιασμός για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων. Ο στόχος του πρώτου παραγοντικού σχεδιασμού ήταν να προσδιοριστεί η επίδραση κάποιων βασικών παραμέτρων στις δύο διαδικασίες. Αρχικά, επιλέχθηκε να σχεδιαστούν παραγοντικά πειράματα για την ενζυμική υδρόλυση με παράμετρο αριστοποίησης την απόδοση της σακχαροποίησης, ενώ οι ρυθμιστικές παράμετροι ήταν οι κύριες λειτουργικές συνθήκες, όπως το φορτίο των στερεών, ο τύπος και η δοσολογία των ενζύμων. Ο δεύτερος παραγοντικός σχεδιασμός αφορούσε στην αερόβια ζύμωση προς καλλιέργεια μαγιάς με παράμετρο αριστοποίησης την απόδοση της και ρυθμιστικές παραμέτρους την προσθήκη θρεπτικών, την αναλογία γλυκόζης/μαγιάς και το περιβάλλον pH. Η επίδραση των ρυθμιστικών παραμέτρων και των δύο συστημάτων εκτιμήθηκαν από 2³ παραγοντικά πειράματα και η σημαντικότητά τους εκτιμήθηκε και αξιολογήθηκε.

8.1.1 1^{ος} παραγοντικός σχεδιασμός: Βελτιστοποίηση σακχαροποίησης

Ο πρώτος παραγοντικός κύκλος πειραμάτων σχεδιάστηκε προκειμένου να εξετασθεί η επίδραση τριών παραγόντων στην διαδικασία της σακχαροποίησης χρησιμοποιώντας φλοιούς πορτοκαλιών. Οι τρεις παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν η ποσότητα του ενζύμου Pectinex, η ποσότητα του ενζύμου CellicTec3 και το φορτίο των στερεών. Η παράμετρος αριστοποίησης ήταν η απόδοση της σακχαροποίησης μέσω ενζυμικής υδρόλυσης. Για τον παραγοντικό σχεδιασμό όπως αναφέρθηκε στο

Κεφάλαιο 6 είναι απαραίτητο να οριστεί το χαμηλότερο και το υψηλότερο επίπεδο και το κέντρο του πειράματος. Τα επίπεδα των ρυθμιστικών παραμέτρων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11). Η επιλογή των επιπέδων έγινε με βάση την βιβλιογραφία⁵⁹ και κάποια προκαταρκτικά πειράματα.

Πίνακας 11: Επίπεδα 1^{ου} παραγοντικού σχεδιασμού.

Ρυθμιστικός παράγοντας	Χαμηλό επίπεδο (-)	Υψηλό επίπεδο (+)	Κέντρο
Pectinex (μL/g στερεού)	25	75	50
CellicCTec3 (μL/g στερεού)	25	75	50
Loading (%)	2.5	7.5	5

Εφόσον ο αριθμός των παραγόντων είναι $k = 3$, τότε το πλήθος των μετρήσεων είναι 2^3 , δηλαδή 8 μετρήσεις για καθεμιά από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις. Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις στο κέντρο του πειραματικού σχεδιασμού. Έτσι, ο πειραματικός σχεδιασμός διαμορφώνεται όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Από τα δεδομένα που προέκυψαν σχηματίστηκε ένα μαθηματικό μοντέλο, το οποίο ελέγχθηκε ως προς την επάρκειά του χρησιμοποιώντας το κριτήριο Fisher.

Πίνακας 12: Πειραματικές δοκιμές σακχαροποίησης χρησιμοποιώντας φλοιούς πορτοκαλιών.

Experiments	Pectinex (μL/ g στερεού)	CellicCTec3 (μL/g στερεού)	Loading (%)
1	25	25	2.5
2	25	25	2.5
3	25	25	7.5
4	25	25	7.5
5	25	75	2.5
6	25	75	2.5
7	25	75	7.5
8	25	75	7.5
9	75	25	2.5
10	75	25	2.5
11	75	25	7.5
12	75	25	7.5
13	75	75	2.5
14	75	75	2.5
15	75	75	7.5
16	75	75	7.5
17	50	50	5
18	50	50	5
19	50	50	5
20	50	50	5

8.1.2 2^{ος} παραγοντικός σχεδιασμός: Βελτιστοποίηση αερόβιας ζύμωσης

Ο δεύτερος πειραματικός σχεδιασμός έγινε με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών καλλιέργειας μονοκυτταρικής πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας το υδρόλυμα που προέκυψε από το πείραμα που έγινε στον πιλότο. Οι τρεις παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν η προσθήκη θρεπτικών, η αναλογία μαγιάς/γλυκόζης (w/w) και η ρύθμιση pH. Η παράμετρος αριστοποίησης ήταν η απόδοση του πειράματος ως προς την παραγωγή μαγιάς. Τα επίπεδα του πειράματος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13). Συγκεκριμένα, η αναλογία μαγιάς/γλυκόζης βασίστηκε σε πρωταρχικά πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί.

Πίνακας 13: Επίπεδα 2^{ου} παραγοντικού σχεδιασμού.

Ρυθμιστικός παράγοντας	Υψηλό επίπεδο (+)	Χαμηλό επίπεδο (-)
Προσθήκη θρεπτικών	Ναι	Όχι
Μαγιά/γλυκόζη (w/w)	1/50	1/200
Ρύθμιση pH	Ναι	Όχι

Εφόσον ο αριθμός των παραγόντων είναι $k = 3$, τότε το πλήθος των μετρήσεων είναι 2^3 , δηλαδή 8 μετρήσεις για καθεμιά από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις. Έτσι, ο πειραματικός σχεδιασμός διαμορφώνεται όπως φαίνεται στον παρακάτω.

Πίνακας 14: Πειραματικές δοκιμές αερόβιας ζύμωσης.

Experiments	Προσθήκη θρεπτικών	Μαγιά/γλυκόζη (w/w)	Ρύθμιση pH
1	NAI	1/50	NAI
2	NAI	1/50	NAI
3	NAI	1/50	OXI
4	NAI	1/50	OXI
5	NAI	1/200	NAI
6	NAI	1/200	NAI
7	NAI	1/200	OXI
8	NAI	1/200	OXI
9	OXI	1/50	NAI
10	OXI	1/50	NAI
11	OXI	1/50	OXI
12	OXI	1/50	OXI
13	OXI	1/200	NAI
14	OXI	1/200	NAI
15	OXI	1/200	OXI
16	OXI	1/200	OXI

8.2 Ανακλιμάκωση διεργασιών σακχαροποίησης και αερόβιας ζύμωσης

Με χρήση των βέλτιστων συνθηκών που προέκυψαν από τον πρώτο και τον δεύτερο παραγοντικό κύκλο πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα στους αντιδραστήρες 4 L.

Στον πρώτο αντιδραστήρα με χρήση φλοιών πορτοκαλιού από την τροφοδοσία 1 πραγματοποιήθηκε σακχαροποίηση, σε συνολικό όγκο 2 L, με προσθήκη των απαραίτητων ενζύμων και το κατάλληλο φορτίο

στερεών. Η σακχαροποίηση διήρκησε 24 ώρες και μετά το πέρας αυτών έγινε διαχωρισμός υγρής και στερεής φάσης με φυγοκέντρηση. Στο πλούσιο σε σάκχαρα υδρόλυμα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης, ενώ η στερεή φάση ξηράνθηκε στους 50 °C για δύο μέρες και προσδιορίστηκε το ολικό άζωτο με την μέθοδο Kjeldahl.

Στον δεύτερο αντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε η παραπάνω σακχαροποίηση χωρίς τον διαχωρισμό υγρού-στερεού και μετρήθηκε η γλυκόζη του διαλύματος. Έπειτα, έγινε αραιώση του διαλύματος με σκοπό η συγκέντρωση της γλυκόζης να είναι 5 g/L. Στη συνέχεια, προστέθηκαν τα θρεπτικά και η μαγιά, ρυθμίστηκε ο αερισμός και το μίγμα αφέθηκε για ανάδευση για 24 ώρες.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση για τον διαχωρισμό της υγρής φάσης από τη στερεή φάση. Στην υγρή προσδιορίστηκε η τελική γλυκόζη και αιθανόλη, ενώ στην στερεή μετά από ξήρανση το ολικό άζωτο.

Επιπλέον, αξιοποιώντας τα αποτελέσματα του πρώτου παραγοντικού κύκλου, πραγματοποιήθηκε σακχαροποίηση με νωπή πρώτη ύλη (τροφοδοσία 2) στις βέλτιστες συνθήκες αμυλολυτικού και πηκτινολυτικού ενζύμου και οργανικού φορτίου, στην πιλοτική μονάδα.

Έτσι, ζυγίστηκε η απαραίτητη ποσότητα φλοιών πορτοκαλιού (τροφοδοσία 2) και προστέθηκε και απιονισμένο νερό για να επιτευχθεί το επιθυμητό φορτίο στερεών. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 50 °C και ξεκίνησε η ανάδευση του μίγματος. Μετρήθηκε το αρχικό pH του μείγματος και ρυθμίστηκε περίπου στο 5. Λήφθηκε δείγμα προκειμένου να προσδιοριστεί η αρχική γλυκόζη και αιθανόλη (τυφλό δείγμα).

Στη συνέχεια, προστέθηκαν στο μίγμα οι απαραίτητες ποσότητες των ενζύμων (25 μL/g TS Pectinex, 25 μL/g TS NS 87014) και συνεχίστηκε η ανάδευση. Τις πρώτες έξι ώρες λαμβάνονταν δείγματα κάθε μία ώρα, στα οποία μετριούνταν η γλυκόζη και η αιθανόλη.

Η σακχαροποίηση διήρκησε 24 ώρες, όπου την 24^η ώρα λήφθηκαν και τα τελευταία δείγματα στα οποία μετρήθηκαν η γλυκόζη, η αιθανόλη, τα TRS και ο TOC.

Μετά το πέρας της διαδικασίας σακχαροποίησης το διάλυμα που προέκυψε περάστηκε από κόσκινα μεγέθους για να διαχωριστεί το στερεό από την υγρή φάση. Το υδρόλυμα αποθηκεύτηκε στο ψυγείο και το στερεό αφυδατώθηκε στους 50 °C για 2 μέρες και στη συνέχεια προσδιορίστηκε το ολικό άζωτο που περιέχει.

Αξίζει να σημειωθεί ότι καταγράφηκε και η ενεργειακή κατανάλωση της διαδικασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1 Σύσταση πρώτων υλών

Ο προμηθευτής της πρώτης ύλης για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ήταν η εταιρεία Hellenic Fruit Juices. Μετά την παραλαβή των τροφοδοσιών πραγματοποιήθηκε αναλυτικός φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των φλοιών πορτοκαλιού, όπως περιεγράφηκε στο Κεφάλαιο 7. Τα αποτελέσματα των δύο τροφοδοσιών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στη συνέχεια (Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Χαρακτηρισμός τροφοδοσίας με την κλασική μέθοδο και την μέθοδο Van Soest.

	Τροφοδοσία 1	Τροφοδοσία 2	M.O.
Ολικά στερεά, TS (%)	15.75±0.23	16.22±1.02	15.98±0.63
Υγρασία (%)	84.25±0.23	83.78±1.02	84.02±0.63
Πτητικά στερεά, VS (%)	95.92±0.09	95.83±0.08	95.88±0.08
Τέφρα (%)	4.08±0.09	4.17±0.08	4.12±0.08
Υδατοδιαλυτά στερεά, WS (%)	17.51±1.28	24.36±0.5	20.93±0.89
Λάδια (%)	2.49±0.00	2.75±0.00	2.62±0
Κυτταρίνη (%)	15.74±1.32	15.75±0.97	15.75±1.15
Ημικυτταρίνη (%)	39.79±1.39	30.66±7.58	35.23±4.48
Αδιάλυτη λιγνίνη, AIL (%)	22.37±1.93	16.77±3.26	19.57±2.59
Διαλυτή λιγνίνη, ASL (%)	1.81±0.07	1.44±0.08	1.62±0.08
Ολικό άζωτο, TN (%)	1.07±0.00	1.07±0.02	1.07±0.01
Πρωτεΐνη (%)	6.66±0.00	6.69±0.11	6.68±0.06
NDF (%)	37.44±2.84	47.17±1.7	42.3±2.27
ADF (%)	26.59±1.30	30.09±1.66	28.34±1.48
ADL (%)	2.58±0.36	7.08±1.77	4.83±1.06

Η περιεκτικότητα σε κυτταρίνη παρουσιάζει σχετικά μικρές αποκλίσεις από τις τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία^{60 26 61 23} και είναι εντός του αναφερόμενου εύρους (13-37% κ.β). Όσον αφορά τη λιγνίνη, οι τιμές που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία^{60 26 61} είναι πολύ κοντά στις πειραματικές τιμές και βρίσκονται εντός του εύρους της βιβλιογραφίας (2-15% κ.β). Το ίδιο ισχύει και για την τέφρα. Σημαντική απόκλιση με τη βιβλιογραφία παρατηρείται στην τιμή της ημικυτταρίνης. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στις διαφορετικές διαδικασίες παραγωγής που ακολουθούνται σε κάθε εργοστάσιο και γενικά στις διάφορες ποικιλίες πορτοκαλιού.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός της εργοστασιακής μαγιάς που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια μονοκυτταρικής πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 16).

Πίνακας 16: Χαρακτηρισμός εργοστασιακής μαγιάς.

Παράμετρος	Τιμή
Ολικά στερεά, TS (%)	96.96±0.06
Υγρασία (%)	3.04±0.06
Πτητικά στερεά, VS (%)	94.34±0.07
Τέφρα (%)	5.66±0.07
Υδατοδιαλυτά στερεά, WS (%)	38.28±1.56
Λάδια (%)	13.19±0.00
Κυτταρίνη (%)	12.26±0.31
Ημικυτταρίνη (%)	11.15±1.95
Αδιάλυτη λιγνίνη, AIL (%)	15.11±2.64
Διαλυτή λιγνίνη, ASL (%)	0.4±0.02
Ολικό άζωτο, TN (%)	7.44±0.04
Πρωτεΐνη (%)	46.51±0.26

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη βρίσκεται κοντά στις τιμές που αναφέρονται στην βιβλιογραφία, δηλαδή βρίσκεται μέσα στο εύρος 39.3 – 48.51% (σε ξηρή βάση).^{62 63 64} Το ίδιο και η τέφρα (1.74 – 4.60% σε ξηρή βάση).^{62 64}

Εκτός από τον τυπικό χαρακτηρισμό των πρώτων υλών, προσδιορίστηκαν τα βαρέα μέταλλα και τα μακρομέταλλα των πρώτων υλών με ατομική απορρόφηση.

Πίνακας 17: Συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων πρώτων υλών.

	Φλούδες πορτοκαλιών	Μαγιά
Cr (mg/kg)	<LOQ	<LOQ
Cu (mg/kg)	<LOQ	0.02
Mn (mg/kg)	<LOQ	0.01
Ni (mg/kg)	<LOQ	<LOQ
Cd (mg/kg)	<LOQ	<LOQ
Pb (mg/kg)	<LOQ	<LOQ
Zn (mg/kg)	0.1	0.37

*LOQ: Level Of Quantification

Όπως είναι αναμενόμενο οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων (Πίνακας 17) στους φλοιούς πορτοκαλιών και τη μαγιά είναι είτε πολύ μικρές είτε δεν ανιχνεύονται καθόλου στα δείγματα.

Πίνακας 18: Συγκεντρώσεις μακρο-μετάλλων πρώτων υλών.

	Φλούδες πορτοκαλιών	Μαγιά
K (mg/kg)	27.3±3.9	17.7±1.6
Na (mg/kg)	1.0±0.9	1.1±0.2
Ca (mg/kg)	128.2±24.5	3.3±0.6
Mg (mg/kg)	9.6±7.4	2.6±1.3
Fe (mg/kg)	<LOQ	<LOQ

*LOQ: Level Of Quantification

Οι συγκεντρώσεις των μακρο-μετάλλων και στις φλούδες πορτοκαλιών εμφανίζονται πολύ χαμηλές σε σχέση με εκείνες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία^{23 28} γενικά για τα εσπεριδοειδή. Επομένως, η σύγκριση αυτών των τιμών με τις βιβλιογραφικές δεν μπορεί να είναι αποδεκτή, γιατί είναι πιθανό να αναφέρονται σε δείγματα διαφορετικών ποικιλιών εσπεριδοειδών και τμημάτων αυτών. Το ίδιο ισχύει και για τα δείγματα της μαγιάς που παρουσιάζουν κι εκείνα πολύ χαμηλές τιμές σε σχέση με τις βιβλιογραφικές⁶⁴.

9.2 1^{ος} πειραματικός κύκλος (παραγοντικός σχεδιασμός σακχαροποίησης)

Τα αποτελέσματα του 1^{ου} πειραματικού κύκλου ως προς την γλυκόζη, τα αναγωγικά σάκχαρα (TRS) και τον ολικό οργανικό άνθρακα (TOC) παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 19: Σύσταση υγρής φάσης πειραμάτων 1^{ου} πειραματικού κύκλου.

Πειράματα	Γλυκόζη (g/L)	TRS (g/L)	TOC (g/L)
1	3.810	1.696	8.172
2	3.452	1.819	8.426
3	13.150	8.821	25.640
4	13.236	11.380	26.120
5	4.383	2.084	9.076
6	4.985	0.734	8.886
7	13.302	19.629	28.550
8	12.589	20.835	27.330
9	3.593	4.540	9.660
10	3.546	3.585	9.365
11	13.007	21.568	29.117
12	13.143	21.313	28.445
13	5.056	7.658	10.330
14	4.916	6.827	9.660
15	13.462	26.934	27.520
16	13.696	29.318	29.305
17	9.369	16.301	18.810
18	9.397	13.706	18.450
19	9.455	15.008	17.590
20	9.798	13.044	18.220

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 19), αυξάνοντας το φορτίο των στερεών αυξάνεται και η περιεκτικότητα των σακχάρων και των οργανικών ενώσεων που περιέχονται στα υδρολύματα, όπως

αναμενόταν. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η ενζυμική υδρόλυση ήταν αποτελεσματική. Σε κάθε περίπτωση, η συνεισφορά της γλυκόζης στον ολικό οργανικό άνθρακα (TOC) ήταν $19.19 \pm 2.00\%$.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον χαρακτηρισμό του ξηρού στερεού υπολείμματος της ενζυμικής υδρόλυσης, ως προς το ολικό άζωτο (TN), τα υδατοδιαλυτά στερεά (WS), την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη, την αδιάλυτη λιγνίνη (AIL) και τη διαλυτή λιγνίνη (ASL), φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 20).

Πίνακας 20: Σύσταση ξηρού στερεού πειραμάτων 1^{ου} πειραματικού κύκλου.

	TN (%)	WS (%)	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	AIL (%)	ASL (%)
1	1.54	14.49	9.08	23.91	22.80	2.16
2	1.68	13.62	8.77	28.52	24.43	2.13
3	1.62	29.13	6.13	19.88	19.74	1.97
4	1.37	29.55	6.71	21.07	21.65	1.97
5	1.87	10.80	9.06	28.44	23.22	2.43
6	1.96	12.41	8.68	28.22	23.38	2.19
7	1.41	32.18	5.58	20.33	19.76	1.47
8	1.39	24.05	5.94	26.16	19.45	1.75
9	1.72	18.34	7.02	24.80	25.34	1.80
10	1.75	16.75	5.93	23.27	26.03	1.91
11	1.94	28.60	5.50	23.28	20.13	1.53
12	1.26	32.67	5.73	26.82	21.29	1.65
13	1.42	13.14	6.41	28.94	22.69	2.15
14	1.37	10.98	6.84	33.32	22.30	2.29
15	1.75	29.16	4.88	22.65	18.80	1.78
16	1.77	31.69	5.46	23.13	19.49	1.57
17	1.54	17.08	6.45	26.33	24.94	1.84
18	1.47	20.52	6.90	29.76	19.88	1.93
19	1.51	21.09	6.29	29.57	19.52	1.81
20	1.49	20.25	5.50	29.32	21.11	1.94

9.3 2^{ος} πειραματικός κύκλος (παραγοντικός σχεδιασμός για την καλλιέργεια μονοκυτταρικής πρωτεΐνης)

Το υδρόλυμα που προέκυψε μετά την πραγματοποίηση του πειράματος της σακχαροποίησης στην πιλοτική μονάδα, υπό τις βέλτιστες συνθήκες (50°C, 7.5% φορτίο στερεών, Pectinex 25μL/g TS, CellicTec3 25 μL/g TS), χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια του *S. Cerevisiae*. Τα αποτελέσματα του δεύτερου παραγοντικού σχεδιασμού για την αερόβια ζύμωση παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 21).

Πίνακας 21: Αποτελέσματα αερόβιας ζύμωσης 2^{ου} πειραματικού κύκλου.

Πειράματα	Προσθήκη θρεπτικών	Μαγιά/Γλυκόζη (w/w)	Ρύθμιση pH	Γλυκόζη (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
1	ΝΑΙ	0.020	ΝΑΙ	0.24	0.27
2	ΝΑΙ	0.020	ΝΑΙ	0.28	0.24
3	ΝΑΙ	0.020	ΟΧΙ	0.04	0.08
4	ΝΑΙ	0.020	ΟΧΙ	0.02	0.05
5	ΝΑΙ	0.005	ΝΑΙ	0.00	0.00
6	ΝΑΙ	0.005	ΝΑΙ	0.00	0.00
7	ΝΑΙ	0.005	ΟΧΙ	0.00	0.00
8	ΝΑΙ	0.005	ΟΧΙ	0.00	0.00
9	ΟΧΙ	0.020	ΝΑΙ	0.02	0.05
10	ΟΧΙ	0.020	ΝΑΙ	0.03	0.06
11	ΟΧΙ	0.020	ΟΧΙ	0.03	0.08
12	ΟΧΙ	0.020	ΟΧΙ	0.05	0.13
13	ΟΧΙ	0.005	ΝΑΙ	0.00	0.03
14	ΟΧΙ	0.005	ΝΑΙ	0.00	0.04
15	ΟΧΙ	0.005	ΟΧΙ	0.00	0.04
16	ΟΧΙ	0.005	ΟΧΙ	0.00	0.05

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, είναι προφανές ότι στις περισσότερες περιπτώσεις καταναλώθηκε το μεγαλύτερο μέρος της γλυκόζης και παράχθηκε ελάχιστη αιθανόλη. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε το πείραμα όπου όλες οι παράμετροι ήταν σε υψηλό επίπεδο (δηλαδή προστέθηκαν θρεπτικά συστατικά, η αναλογία μαγιάς προς γλυκόζη ήταν υψηλή και το pH ρυθμίστηκε). Σε αυτό το πείραμα ανιχνεύθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις τόσο αιθανόλης όσο και γλυκόζης.

9.4 Ανακλιμάκωση διεργασιών σακχαροποίησης και αερόβιας ζύμωσης

Με χρήση των βέλτιστων συνθηκών που προέκυψαν από τον πρώτο και τον δεύτερο παραγοντικό κύκλο πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα στους αντιδραστήρες 4 L.

Στον πρώτο αντιδραστήρα με χρήση φλοιών πορτοκαλιού από την τροφοδοσία 1 πραγματοποιήθηκε σακχαροποίηση, σε συνολικό όγκο 2 L, με προσθήκη 25 μL/g TS Pectinex, 25 μL/g TS NS 87014 και φορτίο 7.5 % ως προς TS. Η σακχαροποίηση διήρκεσε 24 ώρες και μετά το πέρας αυτών έγινε διαχωρισμός υγρής και στερεής φάσης με φυγοκέντρηση. Στο υδρόλυμα μετρήθηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης, ενώ η στερεή φάση αφυδατώθηκε στους 50 °C για δύο μέρες και προσδιορίστηκε το ολικό άζωτο με την μέθοδο Kjeldahl.

Στον δεύτερο αντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε η παραπάνω σακχαροποίηση χωρίς τον διαχωρισμό υγρού-στερεού και μετρήθηκε η γλυκόζη του διαλύματος. Έπειτα, έγινε αραίωση του διαλύματος με σκοπό η συγκέντρωση της γλυκόζης να είναι 5 g/L. Στη συνέχεια, προστέθηκαν τα θρεπτικά και η μαγιά, ρυθμίστηκε ο αερισμός και το μίγμα αφέθηκε για ανάδευση για 24 ώρες.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση για τον διαχωρισμό της υγρής φάσης από τη στερεή φάση. Στην υγρή προσδιορίστηκε η τελική γλυκόζη και αιθανόλη, ενώ στην στερεή μετά από ξήρανση το ολικό άζωτο.

Η σακχαροποίηση που πραγματοποιήθηκε στον 4L αντιδραστήρα υπό τις βέλτιστες συνθήκες (50°C, 7.5% φορτίο στερεών, Pectinex 25μL/g TS, CellicCTec3 25 μL/g TS), οδήγησε σε υδρόλυμα με συγκέντρωση γλυκόζης 13.42 g/L. Επίσης, το στερεό υπόλειμμα φλοιού πορτοκαλιού οδηγήθηκε σε ξήρανση και προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε άζωτο ίση με 1.50±0.17% και σε πρωτεΐνη 9.39±1.09%.

Η αερόβια ζύμωση που πραγματοποιήθηκε υπό τις βέλτιστες συνθήκες (δηλαδή προστέθηκαν θρεπτικά συστατικά, η αναλογία μαγιάς προς γλυκόζη ήταν υψηλή και το pH δεν ρυθμίστηκε), εμπεριέχοντας τους φλοιούς πορτοκαλιών, οδήγησε σε παραγωγή μίγματος ξηρών φλοιών πορτοκαλιού με μαγιά με περιεκτικότητα σε άζωτο 4.04±0.58% και σε πρωτεΐνη 25.27±3.63%. Στην υγρή φάση που προέκυψε φαίνεται να είχε καταναλωθεί όλη η γλυκόζη (0.00 g/L), ενώ παράχθηκε ελάχιστη ποσότητα αιθανόλης ίση με 0.04 g/L.

Είναι φανερό ότι η διαμόρφωση μιας ζωοτροφής που προκύπτει από το υδρόλυμα μαζί με τους φλοιούς πορτοκαλιών της σακχαροποίησης μαζί με την στερεά φάση της ζύμωσης δίνει ένα προϊόν με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη σχεδόν τριπλάσια από εκείνο που προκύπτει απλά με σακχαροποίηση.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια για περαιτέρω ανακλιμάκωση της διεργασίας της σακχαροποίησης αξιοποιώντας τα αποτελέσματα του πρώτου παραγοντικού κύκλου, με νωπή πρώτη ύλη (τροφοδοσία 1) στις βέλτιστες συνθήκες και προσθήκη 25 μL/g TS Pectinex, 25 μL/g TS NS 87014 και φορτίο 7.5 %. Δυστυχώς δεν ήταν δυνατή η ανακλιμάκωση της αερόβιας ζύμωσης καθώς η πιλοτική μονάδα βιομετατροπής δεν έχει τη δυνατότητα αερισμού.

Έτσι, ζυγίστηκαν 37.8 kg φλοιών πορτοκαλιού (τροφοδοσία 2) και 43.8 L απιονισμένο νερό για να επιτευχθεί το επιθυμητό φορτίο στερεών και προστέθηκαν στον αντιδραστήρα. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 50 °C και ξεκίνησε η ανάδευση του μίγματος. Το αρχικό pH του μείγματος ήταν περίπου 3.3 και ρυθμίστηκε σε 5.6. Μετά από 2.5 ώρες, η θερμοκρασία είχε φτάσει στην επιθυμητή, λήφθηκε δείγμα προκειμένου να προσδιοριστεί η αρχική γλυκόζη και αιθανόλη (τυφλό δείγμα).

Στη συνέχεια, προστέθηκαν στο μίγμα 153.09 mL Pectinex και 153.09 mL NS 87014 που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 25μL/g TS και 25μL/g TS αντίστοιχα και συνεχίστηκε η ανάδευση. Τις πρώτες έξι ώρες λαμβάνονταν δείγματα κάθε μία ώρα, στα οποία μετριούνταν η γλυκόζη και η αιθανόλη.

Η σακχαροποίηση διήρκεσε 24 ώρες, όπου την 24^η ώρα λήφθηκαν και τα τελευταία δείγματα στα οποία μετρήθηκαν η γλυκόζη, η αιθανόλη, τα TRS και ο TOC.

Μετά το πέρας της διαδικασίας σακχαροποίησης το διάλυμα που προέκυψε περάστηκε από κόσκινα για να διαχωριστεί το στερεό από την υγρή φάση. Το υδρόλυμα αποθηκεύτηκε στο ψυγείο και το στερεό αφυδατώθηκε στους 50 °C για 2 μέρες και στη συνέχεια προσδιορίστηκε το ολικό άζωτο που περιέχει.

Στο τέλος του πειράματος υδρόλυσης, υπολογίστηκε η συγκέντρωση γλυκόζης και αιθανόλης στο υδρόλυμα.

Πίνακας 22: Μετρήσεις συγκεντρώσεων γλυκόζης και αιθανόλης ενζυμικής υδρόλυσης στην πιλοτική μονάδα.

Δείγμα	Γλυκόζη (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
0h	3.17	0.2
1h	7.95	0.2
2h	8.05	0.2
3h	10.14	0.2
4h	10.02	0.2
5h	11.81	0.2
6h	11.21	0.2
24h	15.25	0.8

Μετά από 24 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης, η συγκέντρωση γλυκόζης του υδρολύματος ήταν ίση με 15.25g/L, δηλαδή σύμφωνη με τα πειραματικά αποτελέσματα εργαστηριακής κλίμακας (13.19±0.06g/L). Αυτό σημαίνει ότι η κλιμάκωση μεγέθους της σακχαροποίησης δεν επηρέασε αρνητικά τη διαδικασία σακχαροποίησης.

Η συνολική ενεργειακή κατανάλωση της διεργασίας στην πιλοτική μονάδα ήταν 24 kWh.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 : ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

10.1 Αποτελέσματα 1^{ου} παραγοντικού σχεδιασμού

Λαμβάνοντας υπόψη τις μετρήσεις και τα αποτελέσματα των πειραμάτων υπολογίστηκαν τα δευτερογενή αποτελέσματα της διαδικασίας σακχαροποίησης. Στη συνέχεια

Πίνακας 23), παρουσιάζονται οι τιμές της αποδοτικότητας της αποικοδόμησης των ολικών στερεών, της κντταρίνης, της ημικντταρίνης και η απόδοση της σακχαροποίησης.

Πίνακας 23: Αποδοτικότητα αποικοδόμησης και απόδοση σακχαροποίησης πειραμάτων 1^{ου} πειραματικού κύκλου.

Πειράματα	Pectinex (μL/g TS)	CellicCTec3 (μL/g TS)	Φόρτιση στερεών (%)	Αποικοδόμηση TS (%)	Αποικοδόμηση Κυτταρίνης (%)	Αποικοδόμηση Ημικυτταρίνης (%)	Απόδοση σακχαροποίησης Y _s (g γλυκόζη/100g TS)
1-2	25	25	2.5	57.14±0.01	75.07±0.58	71.04±3.6	12.44±0.99
3-4	25	25	7.5	41.99±2.93	75.77±0.31	69.42±0.29	14.57±0.08
5-6	25	75	2.5	59.4±1.04	76.53±1.28	70.36±0.92	16.55±1.66
7-8	25	75	7.5	47.13±0.92	80.16±0.53	68.38±5.07	14.27±0.62
9-10	75	25	2.5	59.41±0.7	82.86±2.28	74.84±1.56	12.20±0.13
11-12	75	25	7.5	50.42±0.63	81.86±0.72	67.97±3.61	14.43±0.12
13-14	75	75	2.5	66.25±1.09	79.69±0.61	62.26±3.15	17.73±0.39
15-16	75	75	7.5	52.93±0.76	88.65±0.54	80.09±0.35	15.05±0.20
17-20	50	50	5.0	55.06±1.23	81.62±1.37	66.73±1.56	16.34±0.38

Όπως φαίνεται και στον

Πίνακα 23, η μεγαλύτερη απόδοση σακχαροποίησης, όπως ορίστηκε, ήταν $17.73 \pm 0.39\%$ όταν τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό τις εξής συνθήκες: 75 μL Pectinex /g TS, 75 CellicCTec3/g TS και 2.5% φορτίο στερεών.

Ωστόσο, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλυκόζης 13.579 ± 0.166 g/L και 13.193 ± 0.061 g/L (Πίνακας 19) παρατηρήθηκαν στα πειράματα 15-16 και 3-4, αντίστοιχα, όπου και στις δύο περιπτώσεις το φορτίο των στερεών ήταν 7.5%. Στα πειράματα 15-16 οι ποσότητες των ενζύμων ήταν 75 $\mu\text{L/g}$ TS για κάθε τύπο, ενώ στα 3-4 ήταν 25 $\mu\text{L/g}$ TS. Οι αποδόσεις σακχαροποίησης αυτών των πειραμάτων υπολογίστηκαν περίπου στο 15%. Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τα πειραματικά αποτελέσματα και τους τεχνοοικονομικούς παράγοντες (π.χ. κόστος ενζύμων, ελαχιστοποίηση των αναγκών σε νερό, μικρότερους όγκους αντιδραστήρων), αποφασίστηκε οι πιλοτικές δοκιμές της διεργασίας σακχαροποίησης να διεξαχθούν στους 50°C , 7.5% φορτίο στερεών, Pectinex 25 $\mu\text{L/g}$ TS και CellicCTec3 25 $\mu\text{L/g}$ TS.

10.1.1 Υπολογισμός μέσων τιμών και στατιστικού σφάλματος

Προτού αρχίσει η διαδικασία εύρεσης του μοντέλου της πειραματικής διαδικασίας πρέπει πρώτα να εκτιμηθεί το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων καθώς επίσης και η ομοιογένεια των διακυμάνσεων των πειραματικών μετρήσεων.

Για να υπολογιστεί το τυπικό σφάλμα (s) πρέπει πρώτα να υπολογιστεί η διασπορά (s^2) των πειραματικών μετρήσεων. Η διασπορά υπολογίστηκε ποσοτικά βάση του πίνακα (Πίνακας 24). Στον Πίνακα 24, στην πρώτη στήλη απεικονίζεται ο αριθμός της κάθε επανάληψης. Στη δεύτερη στήλη απεικονίζονται οι μετρήσεις της απόδοσης για κάθε επανάληψη. Στην τρίτη στήλη παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της απόδοσης κάθε δοκιμής, ενώ στην τέταρτη στήλη απεικονίζονται οι διασπορές των δοκιμών. Στην πέμπτη στήλη αναγράφονται οι βαθμοί ελευθερίας για κάθε δοκιμή και τέλος, στη τελευταία γραμμή υπολογίζεται η συνολική διασπορά των πειραματικών μετρήσεων.

Οι σχέσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον πίνακα και τον υπολογισμό της μέσης τιμής κάθε δοκιμής, της διασποράς κάθε δοκιμής και της ολικής διασποράς των αποτελεσμάτων είναι οι εξής:

$$Y_{\text{μέσο}} = \frac{\sum_i^N Y_i}{N} \quad 10.1$$

όπου,

Y_i : απόδοση κάθε επανάληψης

N: οι επαναλήψεις για κάθε δοκιμή

$$s_i^2 = \frac{\sum_i^n (Y_i - Y_{\text{μέσο}})^2}{n - 1} \quad 10.2$$

όπου,

$Y_{\text{μέσο}}$: μέση τιμή κάθε δοκιμής
 n : πλήθος επαναλήψεων ($n=2$)

$$s_Y^2 = \frac{\sum_i^m f_i s_i^2}{\sum_i^m f_i} \quad 10.3$$

Όπου,
 s_i^2 :κάθε μια από τις διακυμάνσεις του σχεδιασμού
 f_i : αντίστοιχοι βαθμοί ελευθερίας.

Οι βαθμοί ελευθερίας του συστήματος υπολογίζονται από τον τύπο $f=N-(k+1)$ όπου N οι δοκιμές του παραγοντικού σχεδιασμού και k οι ρυθμιστικές παράμετροι. Άρα για το μοντέλο της παρούσας εργασίας, όπου $N=8$ και $k=3$ προκύπτει ότι οι βαθμοί ελευθερίας είναι $f=4$.

Πίνακας 24: Επεξεργασία αποτελεσμάτων για την εύρεση του σφάλματος για απόδοση.

A/A	Y_i	$Y_{\text{μέσο}}$	s_i^2	f_i
1	13.14	12.44	0.99	1
2	11.74			
3	14.52	14.57	0.08	1
4	14.63			
5	15.38	16.55	1.66	1
6	17.72			
7	14.71	14.27	0.62	1
8	13.83			
9	12.29	12.20	0.13	1
10	12.11			
11	14.34	14.43	0.12	1
12	14.51			
13	18.00	17.73	0.39	1
14	17.45			
15	14.91	15.05	0.20	1
16	15.19			
$s_Y^2=0.54$				

Με τον υπολογισμό της διασποράς S_Y^2 υπολογίζεται εύκολα η τυπική απόκλιση ή τυπικό σφάλμα σύμφωνα με την εξίσωση:

$$s = \sqrt{s^2} \quad 10.4$$

Άρα, τελικά $s=0.74$.

Στη συνέχεια πρέπει να εξεταστεί η ομοιογένεια των διασπορών καθώς αν δεν είναι ομοιογενείς υπάρχει κίνδυνος να οδηγηθούμε σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε είναι το κριτήριο Cochran. Στο κριτήριο Cochran, υπολογίζεται το πηλίκο της μεγαλύτερης διασποράς με το άθροισμα όλων των διασπορών (G_{exp}). Στη περίπτωση που μελετάται ο λόγος αυτός είναι:

$$G = \frac{s_{max}^2}{\sum_i^N s_i^2} \quad 10.5$$

Άρα : $G_{exp} = 0.61$

Για να υπάρχει ομοιογένεια πρέπει η τιμή αυτή να είναι μικρότερη από την αντίστοιχη (G_{tab}) του πίνακα Cochran. Για το G_{tab} λαμβάνεται υπόψη η τιμή του πίνακα για $N=8$ (δοκιμές) και $f=1$ (βαθμοί ελευθερίας), η οποία είναι $G_{tab} = 0.68$. Όπως είναι φανερό, $G_{exp} < G_{tab}$ επομένως υπάρχει ομοιογένεια στις τιμές των διασπορών και η διαδικασία εύρεσης του μοντέλου μπορεί να συνεχιστεί.

10.1.2 Υπολογισμός των συντελεστών των παραγόντων

Βασικός στόχος του παραγοντικού σχεδιασμού 2^3 είναι η προσέγγιση των συντελεστών του μοντέλου:

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 \quad 10.6$$

όπου

X_1, X_2, X_3 : παράγοντες σχεδιασμού

b_1, b_2, b_3 : οι συντελεστές των παραγόντων

$b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$: οι συντελεστές των αλληλεπιδράσεων των παραγόντων

Y : μέσος όρος της παραμέτρου βελτιστοποίησης για κάθε δοκιμή

Στο συγκεκριμένο σχεδιασμό η παράμετρος βελτιστοποίησης είναι η απόδοση κάθε δοκιμής. Με τη πραγματοποίηση των 16 πειραμάτων, δύο για κάθε δοκιμή του 2^3 παραγοντικού πειράματος, υπολογίζεται η μέση τιμή της παραμέτρου βελτιστοποίησης για κάθε δοκιμή, ώστε να υπολογιστούν στη συνέχεια οι αντίστοιχοι συντελεστές b_1, b_2, b_3 αλλά και οι συντελεστές $b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$. Οι συντελεστές $b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$ είναι οι συντελεστές της αλληλεπίδρασης των παραμέτρων $X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3, X_1X_2X_3$, αντίστοιχα, οι οποίοι υπολογίζονται καθώς δείχνουν τη σημασία της ενδοδράσης.

Οι συντελεστές προκύπτουν από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$b_0 = \frac{(+Y_1)(+Y_2)(+Y_3)(+Y_4)(+Y_5)(+Y_6)(+Y_7)(+Y_8)}{8} \quad 10.7$$

$$b_1 = \frac{(+Y_1(+Y_2(+Y_3(+Y_4(-Y_5(-Y_6(-Y_7(-Y_8$$
 10.8

$$b_2 = \frac{(+Y_1(+Y_2(-Y_3(-Y_4(+Y_5(+Y_6(-Y_7(-Y_8$$
 10.9

$$b_3 = \frac{(+Y_1(-Y_2(+Y_3(-Y_4(+Y_5(-Y_6(+Y_7(-Y_8$$
 10.10

$$b_{12} = \frac{(+Y_1(+Y_2(-Y_3(-Y_4(-Y_5(-Y_6(+Y_7(+Y_8$$
 10.11

$$b_{13} = \frac{(+Y_1(-Y_2(+Y_3(-Y_4(-Y_5(+Y_6(-Y_7(+Y_8$$
 10.12

$$b_{23} = \frac{(+Y_1(-Y_2(-Y_3(+Y_4(+Y_5(-Y_6(-Y_7(+Y_8$$
 10.13

$$b_{123} = \frac{(+Y_1(-Y_2(-Y_3(+Y_4(-Y_5(+Y_6(+Y_7(-Y_8$$
 10.14

Παρακάτω, φαίνονται οι κωδικοποιημένες τιμές των παραμέτρων (Πίνακας 25) σύμφωνα με τις οποίες δημιουργήθηκαν οι εξισώσεις και οι τιμές Y (αποδόσεις) που χρειάστηκαν για τον υπολογισμό τους.

Πίνακας 25: Δεδομένα υπολογισμού συντελεστών b.

N	Υ _{μέσο}	X ₀	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃	X ₁ X ₂ X ₃
1	0.83	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	0.92	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
3	0.57	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	0.75	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
5	0.36	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
6	0.18	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	0.81	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1

8	0.72	1	1	1	1	1	1	1	1
---	------	---	---	---	---	---	---	---	---

Στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 26), καταγράφονται οι τελικές τιμές των συντελεστών b της εξίσωσης Y όπως υπολογίστηκαν από τα δεδομένα του προηγούμενου (Πίνακας 25).

Πίνακας 26: Συντελεστές b της εξίσωσης της παραμέτρου αριστοποίησης.

Συντελεστές b	
b_0	14.46
b_1	0.95
b_2	-0.04
b_3	0.02
b_{12}	-1.1
b_{13}	0.34
b_{23}	-0.21
b_{123}	-0.59

Μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, προέκυψε το παρακάτω μαθηματικό μοντέλο που συσχετίζει την απόδοση σακχαροποίησης με τους παράγοντες του συστήματος:

$$Y = 14.46 + 0.95X_1 - 0.04X_2 + 0.02X_3 - 1.1X_1X_2 + 0.34X_1X_3 - 0.21X_2X_3 - 0.59X_1X_2X_3 \quad 10.15$$

Το μέγεθος των συντελεστών δείχνει πόση σημασία έχουν στο τελικό αποτέλεσμα της παραμέτρου βελτιστοποίησης, δηλαδή της απόδοσης. Το πρόσημό τους δείχνει πώς θα μεταβληθεί η απόδοση σε πιθανή αύξηση ή μείωση κάποιας ρυθμιστικής παραμέτρου. Τη μεγαλύτερη θετική επίδραση ασκεί ο παράγοντας X_1 .

10.1.3 Έλεγχος σημαντικότητας των συντελεστών

Μετά την εύρεση των συντελεστών των X_1 , X_2 , X_3 και X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 , $X_1X_2X_3$ ακολουθεί ο έλεγχος για το αν είναι σημαντικός καθένας από αυτούς τους συντελεστές. Η σημαντικότητα κάθε συντελεστή ελέγχεται χωριστά χρησιμοποιώντας το κριτήριο κατανομής t - student με τη παρακάτω μέθοδο.

Αρχικά, υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση η διασπορά των συντελεστών s_b^2 :

$$s_b^2 = \frac{S_Y^2}{N} \quad 10.16$$

όπου:

N : ο αριθμός των δοκιμών ($N = 8$)

s_b^2 : η διασπορά των πειραματικών μετρήσεων

Έπειτα, υπολογίζεται το διάστημα Δb από τη σχέση:

$$\Delta b = t \cdot S_b \quad 10.17$$

όπου:

t : η τιμή από το πίνακα κατανομής t - student για επίπεδο σημαντικότητας 95% και βαθμούς ελευθερίας 8 (όσους έχει η διασπορά s_y^2)

S_b^2 : η διασπορά των πειραματικών μετρήσεων

Η τιμή του $t_{95,8}$ βρίσκεται από τον πίνακα t - student με τις τιμές της κατανομής t - student και ισούται με:

$$t_{95,8} = 2.20$$

Η τιμή του S_b υπολογίζεται από τη σχέση (10.9) και ισούται με:

$$S_b = 0.26$$

Συνεπώς, μπορεί να υπολογιστεί το διάστημα Δb και ισούται με:

$$\Delta b = 0.51$$

Για να είναι ένας συντελεστής σημαντικός πρέπει η απόλυτη τιμή του να είναι μεγαλύτερη από το Δb . Στον πίνακα (Πίνακας 27) φαίνονται τα αποτελέσματα του ελέγχου.

Πίνακας 27: Η σημαντικότητα των συντελεστών των παραγόντων.

Συντελεστές b		Δb	Αποτελέσματα
b_0	14.46	Συνθήκη σημαντικότητας: $ b_i > 0.51$	ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_1	0.95		ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_2	-0.04		ΜΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_3	0.02		ΜΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_{12}	-1.1		ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_{13}	0.34		ΜΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_{23}	-0.21		ΜΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_{123}	-0.59		ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 27, κρίνεται σημαντικός ο παράγοντας X_1 και οι αλληλεπιδράσεις X_1X_2 και $X_1X_2X_3$. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να επηρεάσουν την επάρκεια του γραμμικού μοντέλου που σχεδιάστηκε, η οποία θα υπολογιστεί στη συνέχεια.

Επομένως, είναι στατιστικά σημαντική ($\alpha = 0.05$) η ποσότητα του Pectinex (X_1) όπως επίσης και η αλληλεπίδραση και των δύο ενζύμων και η αλληλεπίδραση των δύο ενζύμων με το φορτίο των στερεών. Ακόμη, η μεγαλύτερη επίδραση παρατηρείται όταν αλληλεπιδρούν τα δύο ένζυμα (CellicCTec3 και

Pectinex). Η επίδραση της αλληλεπίδρασης όλων των παραμέτρων (b_{123}) είναι η μικρότερη, επειδή εκτείνεται λιγότερο.

Το (+) στην εξίσωση υποδηλώνει ότι η αύξηση της δοσολογίας του Pectinex οδηγεί στην αύξηση της απόδοσης της σακχαροποίησης, άρα και σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Αντίθετα, το (-) υποδηλώνει αρνητική επίδραση, όπως φαίνεται στις αλληλεπιδράσεις.

Λαμβάνοντας υπόψη μόνο τους στατιστικά σημαντικούς συντελεστές, το παραπάνω μαθηματικό μοντέλο γίνεται:

$$Y = 14.46 + 0.95X_1 - 1.1X_1X_2 - 0.59X_1X_2X_3 \quad 10.18$$

Η επάρκεια αυτού του μαθηματικού μοντέλου που προέκυψε από τον παραγοντικό σχεδιασμό ελέγχθηκε από το κριτήριο του Fisher. Αποδείχθηκε επαρκές.

Με μετατροπή των παραγόντων X_1, X_2, X_3 στη φυσική τους υπόσταση μέσω των εξισώσεων:

$$X_1 = \frac{P - 50}{25}$$

$$X_2 = \frac{C - 50}{25}$$

$$X_3 = \frac{L - 5.0}{2.5}$$

Όπου:

Y_s η απόδοση σακχαροποίησης εκφρασμένη ως g γλυκόζης ανά 100g στερεών

P το ένζυμο Pectinex ($\mu\text{L/g TS}$)

C το ένζυμο CellicCTec3 ($\mu\text{L/g TS}$)

L το φορτίο των στερεών (Loading %)

Τελικά, το μαθηματικό μοντέλο μετατρέπεται στο:

$$Y_s = 12.88 + 0.0316P - 0.0064C - 0.944L + 0.00013PC + 0.01888PL + 0.01888CL - 0.000378PLC \quad 10.19$$

10.1.4 Έλεγχος επάρκειας γραμμικού μοντέλου

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επάρκεια του γραμμικού μοντέλου που προσδιορίστηκε, αρχικά υπολογίζεται η διασπορά της επάρκειας s_{ad}^2 , σύμφωνα με τη σχέση:

$$s_{ad}^2 = \frac{\sum_i^N n_i (Y_i - Y_{\theta\epsilon\omega\rho})^2}{f} \quad 10.20$$

όπου:

Y_i : η μέση πειραματική τιμή για κάθε δοκιμή i

$Y_{\theta\epsilon\omega\rho}$: η θεωρητική τιμή της i δοκιμής που υπολογίζεται από τη γραμμική σχέση

f : βαθμοί ελευθερίας του συστήματος που υπολογίζεται από τη σχέση $f=N-(k+1)$ όπου N ο αριθμός των δοκιμών και k ο αριθμός των παραγόντων. Συνεπώς $f=4$.

n_i : πλήθος επαναλήψεων δοκιμής ($n_i = 2$)

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 28) παρουσιάζονται τα δεδομένα από τα οποία υπολογίστηκε το S_{ad}^2 .

Πίνακας 28: Υπολογισμός της διασποράς της επάρκειας.

N	$Y_{\mu\epsilon\sigma\sigma}$	$Y_{\theta\epsilon\omega\rho}$	$(Y_{\mu\epsilon\sigma\sigma} - Y_{\theta\epsilon\omega\rho})^2$
1	12.44	13.00	0.02
2	14.58	11.81	0.01
3	16.55	14.02	0.25
4	14.27	15.20	0.33
5	12.20	15.92	0.29
6	14.43	17.11	0.38
7	17.73	14.90	0.04
8	15.05	13.72	0.01
$s_{ad}^2 = 0.6625$			

Για τον έλεγχο της επάρκειας του γραμμικού μοντέλου εφαρμόζεται το κριτήριο του Fisher κατά το οποίο υπολογίζεται ο λόγος του Fisher σύμφωνα με τη σχέση:

$$F = \frac{s_{ad}^2}{s_{\gamma}^2} \quad 10.21$$

Η τιμή που θα προκύψει από αυτή τη σχέση πρέπει να ακολουθεί τη κατανομή - F με επίπεδο σημαντικότητας 95% που φαίνεται στον πίνακα Fisher. Επισημαίνεται ότι το S_{ad}^2 έχει 4 βαθμούς ελευθερίας, ενώ για το s_{γ}^2 οι βαθμοί ελευθερίας είναι 8. Έτσι, απεικονίζονται τα αποτελέσματα του κριτηρίου Fisher (Πίνακας 29).

Πίνακας 29: Αποτελέσματα ελέγχου επάρκειας γραμμικού μοντέλου.

Έλεγχος επάρκειας μοντέλου (Fisher)	
Επάρκεια γραμμικού μοντέλου	
$F < F_{tab}$	
F	1.53
F_{tab}	3.84
Επαρκές	ΝΑΙ

Όπως φαίνεται η τιμή του λόγου του Fisher είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του πίνακα Fisher και συνεπώς το γραμμικό μοντέλο είναι επαρκές.

10.2 Αποτελέσματα 2^{ου} παραγοντικού σχεδιασμού

Μετά από επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν κατά τον δεύτερο παραγοντικό κύκλο πειραμάτων προέκυψαν τα δευτερογενή αποτελέσματα της διαδικασίας της αερόβιας ζύμωσης. Παρουσιάζονται οι τιμές των αποδόσεων της αερόβιας ζύμωσης (Πίνακας 30).

Πίνακας 30: Δευτερογενή αποτελέσματα αερόβιας ζύμωσης.

Πειράματα	Προσθήκη θρεπτικών	Μαγιά/Γλυκόζη (w/w)	Ρύθμιση pH	Y _{aer}
1-2	NAI	0.020	NAI	0.83±0.03
3-4	NAI	0.020	OXI	0.92±0.20
5-6	NAI	0.005	NAI	0.57±0.08
7-8	NAI	0.005	OXI	0.75±0.04
9-10	OXI	0.020	NAI	0.36±0.15
11-12	OXI	0.020	OXI	0.18±0.02
13-14	OXI	0.005	NAI	0.81±0.39
15-16	OXI	0.005	OXI	0.72±0.17

Γενικά, επιτεύχθηκαν σχετικά υψηλές αποδόσεις (0.92±0.20 g/g). Η χαμηλότερη απόδοση (0.18±0.02 g/g) επιτεύχθηκε στο πείραμα όπου δεν προστέθηκαν θρεπτικά συστατικά, η αναλογία μαγιάς προς γλυκόζη ήταν υψηλή και δεν υπήρχε ρύθμιση του pH. Ασφαλή συμπεράσματα δεν μπορούν να εξαχθούν από τον Πίνακα 30, αλλά από τη μαθηματική επεξεργασία του παραγοντικού πειράματος.

10.2.1 Υπολογισμός μέσων τιμών και στατιστικού σφάλματος

Προτού αρχίσει η διαδικασία εύρεσης του μοντέλου της πειραματικής διαδικασίας πρέπει πρώτα να εκτιμηθεί το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων καθώς επίσης και η ομοιογένεια των διακυμάνσεων των πειραματικών μετρήσεων.

Για να υπολογιστεί το τυπικό σφάλμα (s) πρέπει πρώτα να υπολογιστεί η διασπορά (s²) των πειραματικών μετρήσεων. Η διασπορά υπολογίστηκε ποσοτικά βάση του επόμενου πίνακα (Πίνακας 31). Σε αυτόν, στην πρώτη στήλη απεικονίζεται ο αριθμός της κάθε επανάληψης. Στη δεύτερη στήλη απεικονίζονται οι μετρήσεις της απόδοσης για κάθε επανάληψη. Στην τρίτη στήλη παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της απόδοσης κάθε δοκιμής, ενώ στην τέταρτη στήλη απεικονίζονται οι διασπορές των δοκιμών. Στην πέμπτη στήλη αναγράφονται οι βαθμοί ελευθερίας για κάθε δοκιμή και τέλος, στη τελευταία γραμμή υπολογίζεται η συνολική διασπορά των πειραματικών μετρήσεων.

Οι βαθμοί ελευθερίας του συστήματος υπολογίζονται από τον τύπο $f=N-(k+1)$ όπου N οι δοκιμές του παραγοντικού σχεδιασμού και k οι ρυθμιστικές παράμετροι. Άρα για το μοντέλο της παρούσας εργασίας, όπου N=8 και k=3 προκύπτει ότι οι βαθμοί ελευθερίας είναι f=4.

Πίνακας 31: Επεξεργασία αποτελεσμάτων για την εύρεση του σφάλματος για απόδοση.

A/A	Y _i	Y _{μέσο}	S _i ²	f _i
1	0.809	0.83	0.00	1
2	0.851			
3	1.055	0.92	0.04	1
4	0.778			
5	0.512	0.57	0.01	1
6	0.619			
7	0.725	0.75	0.00	1
8	0.776			
9	0.468	0.36	0.02	1
10	0.256			
11	0.167	0.18	0.00	1
12	0.200			
13	0.534	0.81	0.15	1
14	1.088			
15	0.832	0.72	0.03	1
16	0.598			
S_y²=0.03				

Με τον υπολογισμό της διασποράς S_y² υπολογίζεται εύκολα η τυπική απόκλιση ή τυπικό σφάλμα σύμφωνα με την εξίσωση:

$$s = \sqrt{s^2}$$

Άρα, τελικά s=0.18.

Στη συνέχεια πρέπει να εξεταστεί η ομοιογένεια των διασπορών καθώς αν δεν είναι ομοιογενείς υπάρχει κίνδυνος να οδηγηθούμε σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε είναι το κριτήριο Cochran. Στο κριτήριο Cochran, υπολογίζεται το πηλίκο της μεγαλύτερης διασποράς με το άθροισμα όλων των διασπορών(G_{exp}). Στη περίπτωση που μελετάται ο λόγος αυτός είναι:

$$G = \frac{s_{max}^2}{\sum_i^N s_i^2}$$

Άρα : G_{exp}=0.15/(0.00+0.04+0.01+0.00+0.02+0.00+0.15+0.03)=0.61

Για να υπάρχει ομοιογένεια πρέπει η τιμή αυτή να είναι μικρότερη από την αντίστοιχη (G_{tab}) του πίνακα Cochran. Για το G_{tab} λαμβάνεται υπόψη η τιμή του πίνακα για N=8 (δοκιμές) και f=1 (βαθμοί ελευθερίας), η οποία είναι G_{tab} = 0.68. Όπως είναι φανερό, G_{exp} < G_{tab} επομένως υπάρχει ομοιογένεια στις τιμές των διασπορών και η διαδικασία εύρεσης του μοντέλου μπορεί να συνεχιστεί.

10.2.2 Υπολογισμός των συντελεστών των παραγόντων

Ο υπολογισμός των συντελεστών του μαθηματικού μοντέλου γίνεται με ανάλογο τρόπο με εκείνον που ακολουθήθηκε προηγουμένως για τον πρώτο παραγοντικό σχεδιασμό.

Ομοίως, η παράμετρος βελτιστοποίησης είναι η απόδοση κάθε δοκιμής. Με τη πραγματοποίηση των 16 πειραμάτων, δύο για κάθε δοκιμή του 2^3 παραγοντικού πειράματος, υπολογίζεται η μέση τιμή της παραμέτρου βελτιστοποίησης για κάθε δοκιμή, ώστε να υπολογιστούν στη συνέχεια οι αντίστοιχοι συντελεστές b_1, b_2, b_3 αλλά και οι συντελεστές $b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$. Οι συντελεστές $b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$ είναι οι συντελεστές της αλληλεπίδρασης των παραμέτρων $X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3, X_1X_2X_3$, αντίστοιχα, οι οποίοι υπολογίζονται καθώς δείχνουν τη σημασία της ενδοδράσης.

Ακολουθούν οι κωδικοποιημένες τιμές των παραμέτρων σύμφωνα με τις οποίες δημιουργήθηκαν οι εξισώσεις και οι τιμές Y (αποδόσεις) που χρειάστηκαν για τον υπολογισμό τους (Πίνακας 32).

Πίνακας 32: Δεδομένα υπολογισμού συντελεστών b .

N	$Y_{\text{μέσο}}$	X_0	X_1	X_2	X_3	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	$X_1X_2X_3$
1	0.83	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0.92	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	0.57	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
4	0.75	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
5	0.36	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
6	0.18	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
7	0.81	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
8	0.72	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1

Τελικά, καταγράφονται οι τελικές τιμές των συντελεστών b της εξίσωσης Y (Πίνακας 33) όπως υπολογίστηκαν από τα δεδομένα του προηγούμενου πίνακα.

Πίνακας 33: Συντελεστές b της εξίσωσης της παραμέτρου αριστοποίησης.

Συντελεστές b	
b_0	0.642
b_1	0.124
b_2	-0.069
b_3	0.0004
b_{12}	0.178
b_{13}	-0.068
b_{23}	0.023
b_{123}	0.002

Ως εκ τούτου, αναπτύχθηκε το ακόλουθο μαθηματικό μοντέλο, το οποίο συνδέει την παράμετρο βελτιστοποίησης με τις παραμέτρους ελέγχου του συστήματος:

$$Y_{aer} = 0.642 + 0.124X_1 - 0.069X_2 + 0.0004X_3 + 0.178X_1X_2 - 0.068X_1X_3 + 0.023X_2X_3 + 0.002X_1X_2X_3 \quad 10.22$$

Το μέγεθος των συντελεστών δείχνει πόση σημασία έχουν στο τελικό αποτέλεσμα της παραμέτρου βελτιστοποίησης, δηλαδή της απόδοσης. Το πρόσημό τους δείχνει πώς θα μεταβληθεί η απόδοση σε πιθανή αύξηση ή μείωση κάποιας ρυθμιστικής παραμέτρου. Πιο συγκεκριμένα, οι περισσότερες ρυθμιστικές παράμετροι στο συγκεκριμένο πείραμα έχουν ανάλογη σχέση με την απόδοση με αποτέλεσμα όσο αυξάνονται να αυξάνει και η απόδοση της αερόβιας ζύμωσης. Τη μεγαλύτερη θετική επίδραση ασκεί ο παράγοντας αλληλεπίδρασης X_1X_2 .

10.2.3 Έλεγχος σημαντικότητας των συντελεστών

Μετά την εύρεση των συντελεστών των X_1 , X_2 , X_3 και X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 , $X_1X_2X_3$ ακολουθεί ο έλεγχος για το αν είναι σημαντικός καθένας από αυτούς τους συντελεστές. Η σημαντικότητα κάθε συντελεστή ελέγχεται χωριστά χρησιμοποιώντας το κριτήριο κατανομής t - student με τη παρακάτω μέθοδο.

Αρχικά, η τιμή του S_b υπολογίζεται και ισούται με:

$$S_b = 0.063$$

Η τιμή του $t_{95,8}$ βρίσκεται από τον πίνακα t - student με τις τιμές της κατανομής t - student και ισούται με:

$$t_{95,8} = 1.86$$

Συνεπώς, μπορεί να υπολογιστεί το διάστημα Δb και ισούται με:

$$\Delta b = 0.12$$

Για να είναι ένας συντελεστής σημαντικός πρέπει η απόλυτη τιμή του να είναι μεγαλύτερη από το Δb . Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα του ελέγχου (Πίνακας 34).

Πίνακας 34: Η σημαντικότητα των συντελεστών των παραγόντων.

Συντελεστές b	Δb	Αποτελέσματα
b_0	0.642	ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_1	0.124	ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_2	-0.069	ΜΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_3	0.0004	ΜΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_{12}	0.178	ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_{13}	-0.068	ΜΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_{23}	0.023	ΜΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ
b_{123}	0.002	ΜΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 34, κρίνεται σημαντικός ο παράγοντας X_1 και η ενδοδράση X_1X_2 . Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να επηρεάσουν την επάρκεια του γραμμικού μοντέλου που σχεδιάσθηκε, η οποία θα υπολογιστεί στη συνέχεια.

Λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις στατιστικά σημαντικές παραμέτρους, το μαθηματικό μοντέλο τελικά μετατρέπεται στην ακόλουθη εξίσωση:

$$Y_{aer} = 0.642 + 0.124X_1 + 0.178X_1X_2 \quad 10.23$$

10.2.4 Έλεγχος επάρκειας γραμμικού μοντέλου

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επάρκεια του γραμμικού μοντέλου που προσδιορίστηκε, αρχικά υπολογίζεται η διασπορά της επάρκειας s_{ad}^2 .

Έτσι, παρουσιάζονται τα δεδομένα από τα οποία υπολογίστηκε το S_{ad}^2 (Πίνακας 35).

Πίνακας 35: Υπολογισμός της διασποράς της επάρκειας.

N	$Y_{\text{μέσο}}$	$Y_{\text{θεωρ.}}$	$(Y_{\text{μέσο}} - Y_{\text{θεωρ.}})^2$
1	0.83	0.77	0.00
2	0.92	0.77	0.02
3	0.57	0.77	0.04
4	0.75	0.77	0.00
5	0.36	0.52	0.02
6	0.18	0.52	0.11
7	0.81	0.52	0.09
8	0.72	0.52	0.04
$s_{ad}^2 = 0.16$			

Για τον έλεγχο της επάρκειας του γραμμικού μοντέλου εφαρμόζεται το κριτήριο του Fisher κατά το οποίο υπολογίζεται ο λόγος του Fisher σύμφωνα με την εξίσωση (10.21). Η τιμή που θα προκύψει από αυτή τη σχέση πρέπει να ακολουθεί τη κατανομή - F με επίπεδο σημαντικότητας 95% που φαίνεται στον πίνακα Fisher. Επισημαίνεται ότι το S_{ad}^2 έχει 4 βαθμούς ελευθερίας, ενώ για το s_y^2 οι βαθμοί ελευθερίας είναι 8. Ακολουθούν τα αποτελέσματα του κριτηρίου Fisher (Πίνακας 36).

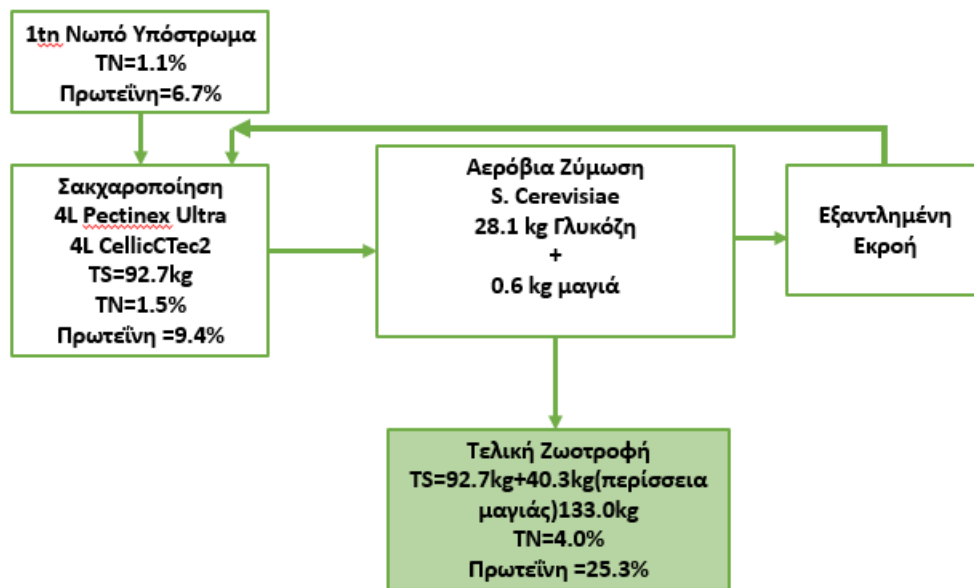
Πίνακας 36: Αποτελέσματα ελέγχου επάρκειας γραμμικού μοντέλου.

Έλεγχος επάρκειας μοντέλου (Fisher)	
Επάρκεια γραμμικού μοντέλου	
F < F_{tab}	
F	2.25
F_{tab}	3.84
Επαρκές	ΝΑΙ

Όπως φαίνεται η τιμή του λόγου του Fisher είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του πίνακα Fisher και συνεπώς το γραμμικό μοντέλο είναι επαρκές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11 : ΣΥΝΘΕΣΗ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραματικών δοκιμών και τις βέλτιστες επιτευχθείσες αποδόσεις, στην Εικόνα 20 παρουσιάζεται ένα ισοζύγιο μάζας της εφαρμοζόμενης επεξεργασίας.



Εικόνα 20: Διάγραμμα ροής και ισοζύγια μάζας της στρατηγικής που εφαρμόστηκε για την επεξεργασία των φλοιών πορτοκαλιού.

Είναι προφανές ότι η εφαρμογή αυτής της στρατηγικής μπορεί να οδηγήσει σε ένα τελικό συστατικό ζωοτροφής με αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (25.3%). Σύμφωνα με τα παρουσιαζόμενα ισοζύγια μάζας προκύπτει ζωοτροφή που αποτελείται από μαγιά κατά 30% και φλοιούς πορτοκαλιού και στη συνέχεια θα οδηγηθεί σε ξήρανση.

Έτσι σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω, η τελική ζωοτροφή μπορεί να διαμορφωθεί με ανάμιξη του στερεού υπολείμματος φλούδας πορτοκαλιού μετά τη διαδικασία σακχαροποίησης υπό τις βέλτιστες συνθήκες (50 °C, 24 ώρες, 7.5% φόρτιση στερεών, Pectinex 25 μL/g TS, CellicCTec3 25 μL /g TS) και προσθήκη μαγιάς στο μη διαχωρισμένο υδρόλυμα φλοιών πορτοκαλιού για να ακολουθήσει αερόβια ζύμωση (30°, 24 ώρες, πηγή σακχάρων φλούδες πορτοκαλιού, αερισμός, προσθήκη θρεπτικών ουσιών, αναλογία μαγιάς προς γλυκόζη ίση με 0.02). Σε αυτό το πλαίσιο, παρασκευάστηκε ένα δείγμα τροφοδοσίας υπό τις βέλτιστες συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω και χαρακτηρίστηκε φυσικοχημικά (Πίνακας 37).

Πίνακας 37: Σύσταση ξηρών επεξεργασμένων φλοιών πορτοκαλιού υπό τις βέλτιστες συνθήκες της εφαρμοζόμενης στρατηγικής.

Συστατικό Ζωοτροφής υπό τις Βέλτιστες Πειραματικές Συνθήκες	
Ολικά στερεά, TS (%)	94.78 ± 1.22
Υγρασία (%)	5.22 ± 1.22
Τέφρα (%)	5.03 ± 0.88
Πτητικά στερεά, VS (%)	94.97 ± 0.88
Λάδια (%)	2.25 ± 0.43
TN (%)	4.04 ± 0.58
Πρωτεΐνη (%)	25.27 ± 3.63
Κυτταρίνη (%)	6.80 ± 0.68
Ημικυτταρίνη (%)	17.94 ± 1.16
Αδιάλυτο υπόλειμμα σε οξύ (%)	18.92 ± 0.56
Εκχύλισμα αιθέρα (%)	2.96 ± 0.41
NDF (%)	28.54 ± 2.31
ADF (%)	17.81 ± 1.98
ADL (%)	6.43 ± 0.17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία παρουσιάστηκε μια καινοτόμος στρατηγική αξιοποίησης για τη μετατροπή των παραπροϊόντων της βιομηχανίας χυμού πορτοκαλιού σε υψηλής αξίας δευτερογενείς ζωοτροφές. Εξετάστηκαν 2 απλές βιοδιεργασίες στην μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Η πρώτη διεργασία αφορούσε στην σακχαροποίηση με ενζυμική υδρόλυση. Ειδικότερα, μελετήθηκε μέσω ενός παραγοντικού σχεδιασμού η βελτιστοποίηση της ενζυμικής υδρόλυσης των αποβλήτων της βιομηχανίας παραγωγής χυμού πορτοκαλιού, κατά την οποία υδρολύεται η πηκτίνη και η κυτταρίνη και προκύπτει υδρόλυμα πλούσιο σε σάκχαρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης του παραγοντικού σχεδιασμού προέκυψε ότι τα δύο ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν (Pectinex, CellicTec3) και η αλληλεπίδρασή τους με το φορτίο ολικών στερεών αποτελούν στατιστικά σημαντικούς παράγοντες επίδρασης στο μοντέλο και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον σχεδιασμό της διεργασίας. Επίσης, με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα και τους τεχνοοικονομικούς παράγοντες (π.χ. κόστος ενζύμων, ελαχιστοποίηση των αναγκών σε απιονισμένο νερό, μικρότεροι όγκοι αντιδραστήρων), οι βέλτιστες συνθήκες για τη διαδικασία σακχαροποίησης που επιλέχθηκαν ήταν 50°C, 7,5% φορτίο στερεών, Pectinex 25μL/g TS, CellicTec3 25 μL/g TS.

Με ανακλιμάκωση της ενζυμικής υδρόλυσης στην πιλοτική μονάδα του εργαστηρίου και εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες, προέκυψαν θετικά αποτελέσματα με την συγκέντρωση της γλυκόζης να βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα από τα αναμενόμενα, 15.25g/L έναντι 13.19±0.06g/L της εργαστηριακής κλίμακας.

Κατά τον 2^ο πειραματικό κύκλο, μελετήθηκε η αερόβια ζύμωση για καλλιέργεια μαγιάς (*S. cerevisiae*). Σχεδιάστηκε ξανά ένας παραγοντικός κύκλος πειραμάτων, κατά την στατιστική ανάλυση του οποίου εντοπίστηκε ότι είναι στατιστικά σημαντικός παράγοντας επίδρασης η προσθήκη θρεπτικών και η

αλληλεπίδρασή της με την αναλογία μαγιάς/γλυκόζης. Τελικά, η υψηλότερη απόδοση αερόβιας ζύμωσης Y_{aer} που επιτεύχθηκε ήταν 0.9 ± 0.2 g/g στο πειραματικό σημείο όπου προστέθηκαν θρεπτικά συστατικά, η αναλογία μαγιάς/γλυκόζης ήταν υψηλή (0.02g/g) και το pH δεν ελέγχθηκε.

Επιπλέον, εφαρμόζοντας και τις δύο διεργασίες διαδοχικά στις βέλτιστές τους συνθήκες αναπτύχθηκε τελικό προϊόν ζωοτροφής με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη $25.27 \pm 3.63\%$, γεγονός που ενθαρρύνει την προσπάθεια για δημιουργία ενός βελτιωμένου προϊόντος από τα απόβλητα πορτοκαλιών.

Συμπερασματικά, σε αυτή την εργασία παρουσιάστηκε μια καινοτόμος στρατηγική αξιοποίησης των υποπροϊόντων της βιομηχανίας χυμού πορτοκαλιού σε δευτερογενή ζωοτροφή υψηλής αξίας. Περιλαμβάνονται απλές βιολογικές διεργασίες που καταφέρνουν να τριπλασιάσουν την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, καθιστώντας τα απόβλητα φλούδας πορτοκαλιού προηγμένο συστατικό ζωοτροφών.

Ωστόσο, ολόκληρη η αξιακή αλυσίδα των φλοιών πορτοκαλιού αποτελείται από έξι κύρια συστατικά και είναι όλα απαραίτητα για την προσθήκη αξίας και τη δημιουργία ανταγωνιστικού πλεονεκτήματος για τη νέα προηγμένη τροφή. Αυτά είναι τα εξής:

1. Πρώτες ύλες: Ο παραγωγός πρώτης ύλης είναι κυρίως η βιομηχανία χυμού πορτοκαλιού.
2. Η παραλαβή, η αποθήκευση, η διατήρηση αποθέματος και η μεταφορά αποτελούν μέρος των εισερχόμενων logistics.
3. Οι λειτουργίες περιλαμβάνουν όλες τις απαραίτητες διαδικασίες για τη μετατροπή της φλούδας πορτοκαλιού σε προϊόντα - ζωοτροφές.
4. Δραστηριότητες όπως η διανομή των τελικών προϊόντων σε έναν πελάτη περιλαμβάνονται στα εξερχόμενα logistics.
5. Οι στρατηγικές που χρησιμοποιούνται στο μάρκετινγκ και τις πωλήσεις για την αύξηση της προβολής και τη στόχευση των σωστών καταναλωτών περιλαμβάνουν την τιμή, τις προωθητικές ενέργειες και τη διαφήμιση.
6. Οι τελικοί χρήστες, που είναι κυρίως εταιρείες ζωοτροφών, διανομείς ζωοτροφών, αγρότες και καταναλωτές προβάτων.

Επομένως, δεν αρκεί να βρεθεί μια κατάλληλη λύση σχετικά με ένα συστατικό κατά μήκος της αξιακής αλυσίδας. Κάθε βήμα κατά μήκος της αξιακής αλυσίδας πρέπει να εξετάζεται και οι αδυναμίες του πρέπει να εντοπίζονται και να αντιμετωπίζονται. Ωστόσο, όταν τα βασικά ζητήματα έχουν αντιμετωπιστεί σωστά, οι βιώσιμες λύσεις μπορεί να ευδοκιμήσουν.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Επιτυγχάνοντας τον σκοπό της συγκεκριμένης εργασίας και λαμβάνοντας υπόψη τα συμπεράσματα που προέκυψαν κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν πιθανοί μελλοντικοί στόχοι και προκλήσεις:

1. Περαιτέρω κλιμάκωση μεγέθους της διαδικασίας της αερόβιας ζύμωσης για καλλιέργεια μαγιάς σε πιλοτική κλίμακα.
2. Περαιτέρω επεξεργασία των παραγοντικών σχεδιασμών εφόσον τα αποτελέσματα έδωσαν μη γραμμικά μοντέλα (κατέστησαν σημαντικές τις αλληλεπιδράσεις). Έτσι, μπορεί να γίνει αξιοποίηση των μετρήσεων πρώτης τάξης και συμπλήρωσή τους με μερικές ακόμα, ώστε να κατασκευασθεί δευτεροβάθμιο μοντέλο.
3. Εξέταση περίπτωσης ξεχωριστής ανάμιξης υδρολυμένου φλοιού πορτοκαλιού από την διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης και παραγόμενης μαγιάς από την διαδικασία της αερόβιας ζύμωσης.
4. Εφόσον τα αποτελέσματα του 1^{ου} παραγοντικού σχεδιασμού έδειξαν υψηλό ποσοστό αποικοδόμησης στερεών με την διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης, θα ήταν χρήσιμο να γίνει προσπάθεια για αύξηση της τελικής μάζας της ζωοτροφής. Επομένως, θα μπορούσε να εξεταστεί η διαμόρφωση ζωοτροφής χρησιμοποιώντας πχ. 500 κιλά νωπή φλούδα για ενζυμική υδρόλυση και ανάμιξη αυτής με 500 κιλά μη επεξεργασμένη φλούδα πορτοκαλιού.
5. Πολύ σημαντικό είναι να διεξαχθούν για τις διεργασίες (ενζυμική υδρόλυση, αερόβια ζύμωση) διαμόρφωσης σύνθετης ζωοτροφής που ακολουθήσαμε αναλύσεις κύκλου ζωής (LCA) και αναλύσεις για το κόστος του κύκλου ζωής της ζωοτροφής (LCC), έτσι ώστε να προκύψουν συμπεράσματα τόσο για το περιβαλλοντικό αντίκτυπο των διεργασιών όσο και για την αειφορία και τη βιωσιμότητά τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) *Markets and Trade - Commodities - Citrus*. fao.org. <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/citrus/en/> (accessed 2022-12-07).
- (2) Favela-Hernández, J. M. J.; González-Santiago, O.; Ramírez-Cabrera, M. A.; Esquivel-Ferriño, P. C.; Camacho-Corona, M. D. R. Chemistry and Pharmacology of Citrus Sinensis. *Molecules* **2016**, *21* (2), 247. <https://doi.org/10.3390/molecules21020247>.
- (3) *Encyclopedia of Food and Health*; Academic Press, 2015.
- (4) *Στοιχεία Παραγωγής, Διανομής και Διάθεσης για την αγορά στην Ε.Ε.-27*. <http://www.minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/crop-production/oporokipeytika/505-esperidoeidi/1709-stoixeia-esper-ee#portokalia> (accessed 2023-01-06).
- (5) Medium-Term Prospects for Raw Materials, Horticulture and Tropical Products.Pdf. <https://www.fao.org/3/i5579e/i5579e.pdf> (accessed 2022-12-12).
- (6) CITRUS FRUIT FRESH AND PROCESSED Statistical Bulletin 2020. <https://www.fao.org/3/cb6492en/cb6492en.pdf>.
- (7) ΕΤΗΣΙΑ ΓΕΩΡΓΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ: Έτος 2019. <https://www.statistics.gr/documents/20181/96929c5c-54d8-ccca-22fe-1c7af02f8bf3> (accessed 2023-01-06).
- (8) *Προϊόντα χυμού πορτοκαλιού - GAIApedia*. http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/%CE%A0%CF%81%CE%BF%CF%8A%CF%8C%CE%BD%CF%84%CE%B1_%CF%87%CF%85%CE%BC%CE%BF%CF%8D_%CF%80%CE%BF%CF%81%CF%84%CE%BF%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%B9%CE%BF%CF%8D (accessed 2023-01-04).
- (9) Hui, Y. H. Fruits: Orange Juice Processing. In *Food Processing*; John Wiley & Sons, Ltd, 2004; pp 361–390. <https://doi.org/10.1002/9780470290118.ch21>.
- (10) Elez-Martínez, P.; Soliva-Fortuny, R. C.; Martín-Belloso, O. Comparative Study on Shelf Life of Orange Juice Processed by High Intensity Pulsed Electric Fields or Heat Treatment. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *222* (3), 321. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0073-3>.
- (11) *Μηχανική Τροφίμων: Κεφάλαιο 7: Εναλλακτικές Θερμικές Και Μη Θερμικές Μέθοδοι Επεξεργασίας*; ΕΜΠ: Αθήνα.
- (12) Rodrigo, D.; Ruíz, P.; Barbosa-Cánovas, G. V.; Martínez, A.; Rodrigo, M. Kinetic Model for the Inactivation of Lactobacillus Plantarum by Pulsed Electric Fields. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *81* (3), 223–229. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00247-7).
- (13) Elez-Martínez, P.; Escolà-Hernández, J.; Soliva-Fortuny, R. C.; Martín-Belloso, O. Inactivation of Lactobacillus Brevis in Orange Juice by High-Intensity Pulsed Electric Fields. *Food Microbiol.* **2005**, *22* (4), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.09.005>.
- (14) Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; Elez-Martínez, P.; De Ancos, B.; Martín-Belloso, O.; Cano, M. P. Impact of High Pressure and Pulsed Electric Fields on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Orange Juice in Comparison with Traditional Thermal Processing. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (11), 4403–4409. <https://doi.org/10.1021/jf048839b>.
- (15) Tiwari, B. K.; O'Donnell, C. P.; Cullen, P. J. Effect of Non Thermal Processing Technologies on the Anthocyanin Content of Fruit Juices. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20* (3), 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.058>.
- (16) Valero, M.; Recrosio, N.; Saura, D.; Muñoz, N.; Martí, N.; Lizama, V. Effects of Ultrasonic Treatments in Orange Juice Processing. *J. Food Eng.* **2007**, *80* (2), 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.06.009>.
- (17) Wilkins, M. R.; Suryawati, L.; Maness, N. O.; Chrz, D. Ethanol Production by Saccharomyces Cerevisiae and Kluyveromyces Marxianus in the Presence of Orange-Peel Oil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *23* (8), 1161–1168. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9346-2>.

- (18) Cypriano, D. Z.; da Silva, L. L.; Tasic, L. High Value-Added Products from the Orange Juice Industry Waste. *Waste Manag.* **2018**, *79*, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.07.028>.
- (19) Rezzadori, K.; Benedetti, S.; Amante, E. R. Proposals for the Residues Recovery: Orange Waste as Raw Material for New Products. *Food Bioprod. Process.* **2012**, *90* (4), 606–614. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.06.002>.
- (20) Martín, M. A.; Siles, J. A.; Chica, A. F.; Martín, A. Biomethanization of Orange Peel Waste. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (23), 8993–8999. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.133>.
- (21) Osorio, L. L. D. R.; Flórez-López, E.; Grande-Tovar, C. D. The Potential of Selected Agri-Food Loss and Waste to Contribute to a Circular Economy: Applications in the Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Molecules* **2021**, *26* (2), 515. <https://doi.org/10.3390/molecules26020515>.
- (22) Erinle, T. J.; Adewole, D. I. Fruit Pomaces—Their Nutrient and Bioactive Components, Effects on Growth and Health of Poultry Species, and Possible Optimization Techniques. *Anim. Nutr.* **2022**, *9*, 357–377. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.11.011>.
- (23) Rivas, B.; Torrado, A.; Torre, P.; Converti, A.; Domínguez, J. M. Submerged Citric Acid Fermentation on Orange Peel Autohydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (7), 2380–2387. <https://doi.org/10.1021/jf073388r>.
- (24) Wang, Y.-C.; Chuang, Y.-C.; Hsu, H.-W. The Flavonoid, Carotenoid and Pectin Content in Peels of Citrus Cultivated in Taiwan. *Food Chem.* **2008**, *106* (1), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.086>.
- (25) Marín, F. R.; Soler-Rivas, C.; Benavente-García, O.; Castillo, J.; Pérez-Alvarez, J. A. By-Products from Different Citrus Processes as a Source of Customized Functional Fibres. *Food Chem.* **2007**, *100* (2), 736–741. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.040>.
- (26) Bicu, I.; Mustata, F. Cellulose Extraction from Orange Peel Using Sulfite Digestion Reagents. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102* (21), 10013–10019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.041>.
- (27) Camargo, D. A.; Pereira, M. S.; dos Santos, A. G.; Fleuri, L. F. Isolated and Fermented Orange and Grape Wastes: Bromatological Characterization and Phytase, Lipase and Protease Source. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2022**, *77*, 102978. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.102978>.
- (28) Bampidis, V. A.; Robinson, P. H. Citrus By-Products as Ruminant Feeds: A Review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2006**, *128* (3), 175–217. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.12.002>.
- (29) US EPA, O. *Waste Management Hierarchy and Homeland Security Incidents*. <https://www.epa.gov/homeland-security-waste/waste-management-hierarchy-and-homeland-security-incidents> (accessed 2023-02-02).
- (30) *Wastes to Biopolymers - To Epyo*. Wastes-to-Biopolymers. <http://www.wastes-to-biopolymers.gr/477ADE0D.el.aspx> (accessed 2023-02-07).
- (31) *Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on Waste and Repealing Certain Directives (Text with EEA Relevance)*; 2018. <http://data.europa.eu/eli/dir/2008/98/2018-07-05/eng> (accessed 2023-02-02).
- (32) EPA, N. *The waste hierarchy*. NSW Environment Protection Authority. <https://www.epa.nsw.gov.au/your-environment/recycling-and-reuse/warr-strategy/the-waste-hierarchy> (accessed 2023-02-02).
- (33) *Waste Framework Directive*. https://environment.ec.europa.eu/topics/waste-and-recycling/waste-framework-directive_en (accessed 2023-02-02).
- (34) *Waste Framework Directive Review - Why We Need Waste Prevention Targets Now*. <https://zerowasteurope.eu/wp-content/uploads/2022/07/Joint-paper-Recommendations-on-Waste-prevention-targets-July-2022.pdf>.
- (35) Vaverková, M. D. Landfill Impacts on the Environment—Review. *Geosciences* **2019**, *9* (10), 431. <https://doi.org/10.3390/geosciences9100431>.

- (36) Negro, V.; Ruggeri, B.; Fino, D.; Tonini, D. Life Cycle Assessment of Orange Peel Waste Management. *Resour. Conserv. Recycl.* **2017**, *127*, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.08.014>.
- (37) Suri, S.; Singh, A.; Nema, P. K. Current Applications of Citrus Fruit Processing Waste: A Scientific Outlook. *Appl. Food Res.* **2022**, *2* (1), 100050. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100050>.
- (38) Ángel Siles López, J.; Li, Q.; Thompson, I. P. Biorefinery of Waste Orange Peel. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2010**, *30* (1), 63–69. <https://doi.org/10.3109/07388550903425201>.
- (39) Wadhwa, M.; Bakshi, M. P. S.; Makkar, H. P. S. Utilization of Fruit and Vegetable Wastes as Livestock Feed and as Substrates for Generation of Other Value-Added Products.
- (40) Feng, N.; Guo, X.; Liang, S.; Zhu, Y.; Liu, J. Biosorption of Heavy Metals from Aqueous Solutions by Chemically Modified Orange Peel. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *185* (1), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.114>.
- (41) *Cattle Feed Market Size, Trends (2022 - 27) | Industry Report.* <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/cattle-feed-market> (accessed 2023-01-17).
- (42) de Oliveira, C. O.; Roll, A. A. P.; Medeiros Gonçalves, F. M.; Lopes, D. C. N.; Xavier, E. G. Olive Pomace for the Feeding of Commercial Poultry: Effects on Performance, Meat and Eggs Quality, Haematological Parameters, Microbiota and Immunity. *Worlds Poult. Sci. J.* **2021**, *77* (2), 363–376. <https://doi.org/10.1080/00439339.2021.1894409>.
- (43) Alhotan, R. A. Commercial Poultry Feed Formulation: Current Status, Challenges, and Future Expectations. *Worlds Poult. Sci. J.* **2021**, *77* (2), 279–299. <https://doi.org/10.1080/00439339.2021.1891400>.
- (44) Duoss-Jennings, H. A.; Schmidt, T. B.; Callaway, T. R.; Carroll, J. A.; Martin, J. M.; Shields-Menard, S. A.; Broadway, P. R.; Donaldson, J. R. Effect of Citrus Byproducts on Survival of O157:H7 and Non-O157 *Escherichia Coli* Serogroups within *In Vitro* Bovine Ruminal Microbial Fermentations. *Int. J. Microbiol.* **2013**, *2013*, e398320. <https://doi.org/10.1155/2013/398320>.
- (45) Using of Citrus By-Products in Farm Animals Feeding. *Open Access J. Sci.* **2017**, *Volume 1* (Issue 3). <https://doi.org/10.15406/oajs.2017.01.00014>.
- (46) Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological Effects of Essential Oils – A Review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46* (2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- (47) *Common Terms Used in Animal Feeding and Nutrition.* <https://extension.uga.edu/publications/detail.html?number=B1367&title=common-terms-used-in-animal-feeding-and-nutrition> (accessed 2023-01-31).
- (48) Friedman, M. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44* (1), 6–29. <https://doi.org/10.1021/jf9400167>.
- (49) Milala, M.; Yakubu, M.; Burah, B.; Laminu, H.; Bashir, H. Production and Optimization of Single Cell Protein from Orange Peels by *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Biosci. Biotechnol. Discov.* **2018**, *3*, 99–104. <https://doi.org/10.31248/JBBD2018.081>.
- (50) *Proteins.* Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/nutrition/requirements/proteins/en/> (accessed 2023-01-12).
- (51) Bratosin, B. C.; Darjan, S.; Vodnar, D. C. Single Cell Protein: A Potential Substitute in Human and Animal Nutrition. *Sustainability* **2021**, *13* (16), 9284. <https://doi.org/10.3390/su13169284>.
- (52) Sharif, M.; Zafar, M. H.; Aqib, A. I.; Saeed, M.; Farag, M. R.; Alagawany, M. Single Cell Protein: Sources, Mechanism of Production, Nutritional Value and Its Uses in Aquaculture Nutrition. *Aquaculture* **2021**, *531*, 735885. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735885>.
- (53) Zhou, Y.-M.; Chen, Y.-P.; Shen, Y. Single Cell Protein-Feed: Taking Orange Waste as Raw Material for Fermentation. In *Advanced Materials and Energy Sustainability*; WORLD SCIENTIFIC, 2017; pp 323–335. https://doi.org/10.1142/9789813220393_0041.

- (54) Reihani, S. F. S.; Khosravi-Darani, K. Influencing Factors on Single-Cell Protein Production by Submerged Fermentation: A Review. *Electron. J. Biotechnol.* **2019**, *37*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.005>.
- (55) Salari, R.; Salari, R. Investigation of the Best *Saccharomyces Cerevisiae* Growth Condition. *Electron. Physician* **2017**, *9* (1), 3592–3597. <https://doi.org/10.19082/3592>.
- (56) Fan, Z. Chapter 7 - Consolidated Bioprocessing for Ethanol Production. In *Biorefineries*; Qureshi, N., Hodge, D. B., Vertès, A. A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2014; pp 141–160. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59498-3.00007-5>.
- (57) De Deken, R. H. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Microbiology* **1966**, *44* (2), 149–156. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>.
- (58) Huang, W.-C.; Tang, I.-C. Chapter 8 - Bacterial and Yeast Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. In *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*; Yang, S.-T., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2007; pp 185–223. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50009-8>.
- (59) Grohmann, K.; Baldwin, E. A. Hydrolysis of Orange Peel with Pectinase and Cellulase Enzymes. *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14* (12), 1169–1174. <https://doi.org/10.1007/BF01027023>.
- (60) Marin, F. R.; Soler-Rivas, C.; Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.; Perez-Alvarez, J. A. By-Products from Different Citrus Processes as a Source of Customized Functional Fibre. *Food Chem.* **2007**, *100* (2), 736–741. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.040>.
- (61) Ververis, C.; Georghiou, K.; Danielidis, D.; Hatzinikolaou, D. G.; Santas, P.; Santas, R.; Corleti, V. Cellulose, Hemicelluloses, Lignin and Ash Content of Some Organic Materials and Their Suitability for Use as Paper Pulp Supplements. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98* (2), 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.007>.
- (62) Bertolo, A. P.; Biz, A. P.; Kempka, A. P.; Rigo, E.; Cavalheiro, D. Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*): Evaluation of Cellular Disruption Processes, Chemical Composition, Functional Properties and Digestibility. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56* (8), 3697–3706. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03833-3>.
- (63) Pacheco, M. T.; Caballero-Córdoba, G. M.; Sgarbieri, V. C. Composition and Nutritive Value of Yeast Biomass and Yeast Protein Concentrates. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **1997**, *43* (6), 601–612. <https://doi.org/10.3177/jnsv.43.601>.
- (64) Yamada, E. A.; Sgarbieri, V. C. Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*) Protein Concentrate: Preparation, Chemical Composition, and Nutritional and Functional Properties. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (10), 3931–3936. <https://doi.org/10.1021/jf0400821>.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 38: Τιμές Cochran G (95% στατιστικής σημαντικότητας)

N	f=n _i -1							
	1	2	3	4	5	6	7	8
2	0.999	0.975	0.939	0.906	0.877	0.853	0.833	0.816
3	0.967	0.871	0.798	0.746	0.707	0.677	0.653	0.633
4	0.907	0.768	0.684	0.629	0.590	0.560	0.637	0.518
5	0.841	0.684	0.598	0.544	0.507	0.478	0.456	0.439
6	0.781	0.616	0.532	0.480	0.445	0.418	0.398	0.382
7	0.727	0.561	0.480	0.431	0.397	0.373	0.354	0.338
8	0.680	0.516	0.438	0.391	0.360	0.336	0.319	0.304

*N=δοκιμές του σχεδιασμού, f=βαθμοί ελευθερίας

Πίνακας 39: Τιμές πίνακα t Student.

f	t.95	t.975	t.99	t.995
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.90	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36

Πίνακας 40: Τιμές λόγου Fisher (95% στατιστικής σημαντικότητας)

f2	f1	1	2	3	4
1		161	200	216	225
2		18.5	19.0	19.2	19.2
3		10.1	9.55	9.28	9.12
4		7.71	6.59	5.59	6.339
5		6.61	5.79	5.41	5.19
6		5.99	5.14	4.76	4.53
7		5.59	4.74	4.35	3.12
8		5.32	4.46	3.07	3.84

*f1: βαθμοί ελευθερίας αριθμητή, f2: βαθμοί ελευθερίας παρονομαστή