



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &  
ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

---

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**

**«Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου»**

**Κατεύθυνση: «Βιοδιεργασίες Τροφίμων & Βιοδιυλιστήρια»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*Αξιοποίηση αποβλήτου από βιομηχανική διεργασία  
παραγωγής χάρτου ως πηγή φαινολικών συστατικών και ως  
θρεπτικό μέσο για μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος*

**ΧΑΡΙΣ Η. ΚΟΝΤΟΥ-ΒΡΕΤΤΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2014**

# **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*Αξιοποίηση αποβλήτου από βιομηχανική διεργασία παραγωγής  
χάρτου ως πηγή φαινολικών συστατικών και ως θρεπτικό μέσο  
για μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος*

**ΧΑΡΙΣ Η. ΚΟΝΤΟΥ-ΒΡΕΤΤΟΥ**

Επιβλέπων: Απόστολος Κουτίνας

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή: Απόστολος Κουτίνας  
Σεραφείμ Παπανικολάου  
Ιωάννης Κούκος

**ΑΘΗΝΑ 2014**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το CSSL (Concentrated Spent Sulphite Liquor) είναι το υγρό απόβλητο της βιομηχανίας παραγωγής χαρτοπολτού και χάρτου, το οποίο προέρχεται από την όξινη θειώδη μέθοδο πολτοποίησης του ξύλου *Eucalyptus globulus*. Το απόβλητο αυτό περιέχει σημαντική ποσότητα φαινολικών ουσιών ( $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) και υψηλή συγκέντρωση σακχάρων ( $176,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), κυρίως ξυλόζης. Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα με το απόβλητο CSSL για τον διαχωρισμό, την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών, καθώς και για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν να αξιοποιηθεί αυτή η ανανεώσιμη πρώτη ύλη ώστε να επιφέρει βιωσιμότητα και αειφορία στη βιομηχανία.

Για την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων αρχικά πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες. Σε σύγκριση με το χλωροφόρμιο, το διαιθυλαιθέρα, το τριχλωροαιθυλένιο και το βενζόλιο, με τον οξικό αιθυλεστέρα ανακτήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό των φαινολικών ουσιών από το απόβλητο. Με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών του αποβλήτου CSSL εκτιμήθηκε ίση με  $9,08 \text{ g GAE}\cdot\text{L}^{-1}$ , μετά από εκχύλιση ενός σταδίου με οξικό αιθυλεστέρα με αναλογία αποβλήτου προς διαλύτη 1:3 v/v. Επιπλέον, αυξάνοντας τα στάδια της εκχύλισης από ένα σε τρία ανακτήθηκε σχεδόν όλη η ποσότητα των φαινολικών συστατικών (94%) και η αναλογία αποβλήτου προς διαλύτη 1:3 v/v αποδείχτηκε αποτελεσματικότερη από την 1:2 v/v. Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμήθηκε με τη μέθοδο DPPH• και βρέθηκε πως το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα είχε τον υψηλότερο δείκτη αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (AAI = 6,88) σε σχέση με τις τιμές AAI των υπόλοιπων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Στη συνέχεια, ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο HPLC-DAD τα εξής φαινολικά συστατικά: συριγγικό οξύ, λαρισιρεσινόλη, βανιλικό οξύ, ισοραμνετίνη, συριγγαλδεΐδη, βανιλίνη, ακετοσυριγγόνη και καφεϊκό οξύ, καθώς επίσης ελλαγικό και γαλλικό οξύ, τα οποία βρέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις στο απόβλητο CSSL ( $699,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  και  $622,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , αντίστοιχα).

Κατά τη διεξαγωγή των ζυμώσεων, παρατηρήθηκε ότι το βακτήριο *Basfia succiniciproducens* ανταποκρίνεται καλύτερα στο υπόστρωμα αραιωμένου 1:10 CSSL, αλλά και στο υπόστρωμα εκχυλισμένου CSSL, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη απόδοση παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και μικρότερη απόδοση παραγωγής παραπροϊόντων σε σχέση με το βακτήριο *Actinobacillus succinogenes*. Στην περίπτωση όπου αφαιρέθηκε το 76% των φαινολικών συστατικών, χρησιμοποιώντας οξικό αιθυλεστέρα ως διαλύτη στην εκχύλιση, η τιμή της απόδοσης παραγωγής του

ηλεκτρικού οξέος από το *B. succiniciproducens* αυξήθηκε κατά 16%, φτάνοντας την τιμή  $0,58 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , και η τιμή της παραγωγικότητας κατά 25%, σε σχέση με το μη επεξεργασμένο απόβλητο. Ενώ, για το *A. succinogenes* η τιμή της απόδοσης παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος αυξήθηκε κατά 25,6%, φτάνοντας την τιμή  $0,49 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , και η τιμή της παραγωγικότητας κατά 30%, αντίστοιχα. Άρα το βακτήριο *A. succinogenes* παρεμποδίζεται περισσότερο από την παρουσία φαινολικών συστατικών στο μέσο της ζύμωσης από ότι το *B. succiniciproducens*. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με το *A. succinogenes* σε θρεπτικό υπόστρωμα μίγματος καθαρών σακχάρων, με συγκέντρωση του κάθε σακχάρου όμοια με αυτή του αραιωμένου 1:10 CSSL, και προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος ( $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Στη συγκέντρωση  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μείωση της απόδοσης (18,5%) και της παραγωγικότητας (26,7%) του ηλεκτρικού οξέος, καθώς και αύξηση της απόδοσης των παραπροϊόντων (33,3%) σε σχέση με το θρεπτικό υπόστρωμα όπου δεν είχε πραγματοποιηθεί προσθήκη της παρεμποδιστικής ουσίας.

Λέξεις κλειδιά: απόβλητο χαρτοβιομηχανίας SSL, εκχύλιση με οργανικό διαλύτη, φαινολικές ενώσεις, αντιοξειδωτική ικανότητα, ασυνεχής ζύμωση, ηλεκτρικό οξύ, *Actinobacillus succinogenes*, *Basfia succiniciproducens*

## ABSTRACT

A major industrial sector, that generates vast amounts of lignocellulosic wastes with environmental negative impact, is the pulp and paper industry. The thick liquid waste stream from the sulphite pulping process of hardwood *Eucalyptus globulus* is called Concentrated Spent Sulphite Liquor (CSSL) and it contains high quantities of various C5 and C6 monosaccharides ( $176.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), mainly xylose, and significant amount of phenolic compounds ( $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). In the present study, several experiments were performed with the CSSL for the separation and the quantitative and qualitative analysis of the content of phenolic compounds, as well as for the evaluation of succinic acid production via fermentation by two selected bacteria. The aim of these experiments was the valorization of this renewable raw material of the pulp and paper industry in order to bring viability and sustainability to the industry.

Initially, liquid-liquid extraction with organic solvents took place for the recovery of phenolic compounds. In comparison with chloroform, diethyl ether, trichloroethylene and benzene, with the ethyl acetate solvent was extracted the highest percentage of phenolic compounds contained in the CSSL. The ethyl acetate extract (one step extraction, hydrolysate to solvent volume ratio was 1:3 v/v) was analyzed in terms of gallic acid equivalents by the Folin-Ciocalteu colorimetric method and the concentration of total phenolic compounds was estimated equal to  $9.08 \text{ g GAE}\cdot\text{L}^{-1}$ . Moreover, increasing the steps of extraction from one to three almost the whole amount of phenolic compounds (94%) was separated and the volume ratio of hydrolysate to solvent 1:3 v/v was more efficient than the ratio 1:2 v/v. The antioxidant activity was determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) method and the ethyl acetate extract had the highest antioxidant activity index (AAI = 6.88) compared with the values of AAI of the other solvents used for the extraction of phenolic components. Then, the phenolic compounds were identified by HPLC-DAD method: syringic acid, lariciresinol, vanillic acid, isorhamnetin, syringaldehyde, vanillin, acetosyringone and caffeic acid, as well as ellagic and gallic acid, which had the highest concentrations in comparison to the other phenolics found in CSSL extract ( $699.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $622.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively).

During fermentations with industrially derived CSSL, it was observed that *Basfia succiniciproducens* achieved higher succinic acid production yield and less by-products formation when the substrate was the diluted 1:10 CSSL or the extracted CSSL, than *Actinobacillus succinogenes*. In case of removing 76% of the total phenolic compounds, using ethyl acetate as extraction solvent, the rate of yield of succinic acid production by *B. succiniciproducens* was increased by 16%, reaching

the value  $0.58 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , and productivity was increased by 25%, in comparison to untreated CSSL. Whereas for the bacterium *A. succinogenes*, the yield of succinic acid was increased by 25.6%, reaching the value  $0.49 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , and productivity was increased by 30%, respectively. Therefore, *A. succinogenes* was more inhibited than *B. succiniciproducens* from the phenolic compounds present in the fermentation medium. For this reason, a set of fermentations with *A. succinogenes* was also carried out using mixed sugars with a sugar proportion similar to the one contained in diluted 1:10 CSSL. Different concentrations of gallic acid ( $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were added to assess the ability of *A. succinogenes* to consume the sugars and to produce succinic acid when the fermentation broth contained an inhibitory compound. At the concentration of  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , it was observed the greatest decrease of the yield (18.5%) and the productivity (26.7%) of succinic acid and the greatest increase of the yield of by-products (33.3%) in comparison with the substrate where there had been no addition of gallic acid.

Keywords: Spent Sulphite Liquor, solvent extraction, phenolic compounds, antioxidant activity, batch fermentation, succinic acid, *Actinobacillus succinogenes*, *Basfia succiniciproducens*

*...τόσα έζησα, τόσα έμαθα, τόσα λέω  
κι απ' όσα διάβασα ένα κρατάω καλά:  
«Σημασία έχει να παραμένεις άνθρωπος»...*

*- Κατερίνα Γώγου, 'Ιδιώνυμο'-*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου με κατεύθυνση «Βιοδιεργασίες Τροφίμων και Βιοδιυλιστήρια» στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014. Το αντικείμενό της αφορά το διαχωρισμό και την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των φαινολικών συστατικών του αποβλήτου χαρτοβιομηχανίας Concentrated Spent Sulphite Liquor (CSSL) και την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από αυτό το απόβλητο μέσω ζύμωσης με χρήση βακτηρίων.

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, συνεργάστηκα με ανθρώπους που ο καθένας με τον τρόπο του κάτι πρόσφερε στην ολοκλήρωση της εργασίας μου. Σε όλους οφείλω τουλάχιστον ένα ευχαριστώ. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, Επίκουρο Καθηγητή Απόστολο Κουτίνα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη συνολική καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Στη συνέχεια, ευχαριστώ τον κ. Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρο Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την παραχώρηση θέσης στο εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων.

Σημαντική ήταν η βοήθεια της Μαίρης Αλεξανδρή, υποψήφιας διδάκτορος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων και στη συνέχεια κατά την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων. Την ευχαριστώ θερμά για τη συμβολή της κατά τη συγγραφή και επιμέλεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Tamara Llano, υποψήφια διδάκτορα του Πανεπιστημίου της Καντάμπρια στο Σανταντέρ της Ισπανίας, για την εποικοδομητική συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της τρίμηνης παραμονής της στην Ελλάδα και την αμέριστη συμπαράσταση που μου έδειξε.

Ιδιαίτερος, ευχαριστώ ολόψυχα την καλύτερή μου φίλη, Άννα-Μαρία, για τη διαρκή στήριξή της και βοήθειά της στη συγγραφή της μεταπτυχιακής μου μελέτης με το δικό της μοναδικό τρόπο. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Νίκο για την αγάπη του, την υπομονή του και την ενθάρρυνση που μου έδειξε. Πλάι του συνειδητοποίησα πόσο εύκολη μπορεί να είναι η πραγματοποίηση στόχων όταν αισθάνεσαι ευτυχισμένος. Και οι δύο ήταν πάντα δίπλα μου να μου μεταδίδουν την αισιόδοξη διάθεσή τους αυτά τα δύο χρόνια και τους ευχαριστώ πολύ για αυτό.



Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου, Ηρακλή και Αντριάνα, που δε μου στέρησαν το όνειρο των σπουδών και με στήριξαν σε δύσκολες εποχές και στον αδελφό μου, Θέμη, που ήταν πάντα δίπλα μου να με εμψυχώνει. Η αγάπη που μου έχουν και τους έχω είναι αναντικατάστατη. Η κατανόηση και εμπιστοσύνη των «δικών» μου ανθρώπων ήταν ανεκτίμητη και λειτούργησε ως η κινητήρια δύναμη να ολοκληρωθεί αυτή η εργασία. Στους τελευταίους θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη...

Χάρις Κοντού-Βρεττού,

Αθήνα, Ιούλιος 2014

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Περίληψη	3
Abstract	5
Ευχαριστίες	8
Περιεχόμενα	10
<b>1. Θεωρητικό μέρος</b>	<b>14</b>
<b>1.1. Εισαγωγή</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Το απόβλητο CSSL της βιομηχανίας χαρτοπολτού και χάρτου</b>	<b>16</b>
1.2.1. <u>Η ετήσια παραγωγή χαρτοπολτού</u>	16
1.2.2. <u>Η όξινη θειώδης πολτοποίηση</u>	18
1.2.3. <u>Το συμπυκνωμένο απόβλητο CSSL της χαρτοβιομηχανίας</u>	21
1.2.4. <u>Αξιοποίηση των αποβλήτων SSL/CSSL της χαρτοβιομηχανίας μέσω ζύμωσης</u>	23
<b>1.3. Φαινολικά συστατικά, τα φυσικά αντιοξειδωτικά</b>	<b>25</b>
1.3.1. <u>Εισαγωγή</u>	25
1.3.2. <u>Δομή και κατηγορίες φαινολικών ενώσεων</u>	26
1.3.3. <u>Βιοσύνθεση φαινολικών ενώσεων</u>	30
1.3.4. <u>Ο όξινος χαρακτήρας της φαινολικής υδροξυλομάδας</u>	31
1.3.5. <u>Αντιοξειδωτική ικανότητα φαινολικών συστατικών</u>	33
1.3.6. <u>Σημασία των φαινολικών ενώσεων και εφαρμογές αυτών</u>	35
<b>1.4. Μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος</b>	<b>36</b>
1.4.1. <u>Το ηλεκτρικό οξύ και εφαρμογές του</u>	36
1.4.2. <u>Τρέχουσα παραγωγή ηλεκτρικού οξέος</u>	39
1.4.3. <u>Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω ζύμωσης</u>	40
1.4.4. <u>Βακτήρια για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος</u>	44
1.4.4.1. <i>Actinobacillus succinogenes</i>	44
1.4.4.2. <i>Basfia succiniciproducens</i>	47
<b>2. Σκοπός μελέτης και συνοπτική περιγραφή του πειράματος</b>	<b>50</b>
<b>3. Υλικά και μέθοδοι</b>	<b>52</b>
<b>3.1. Διαχωρισμός και ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών συστατικών</b>	<b>52</b>
3.1.1. <u>Πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλυτικές μεθόδους</u>	52
3.1.2. <u>Διαλύτες και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην εκχύλιση</u>	53
3.1.3. <u>Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο Folin-Ciocalteu</u>	54
3.1.4. <u>Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο DPPH•</u>	54
3.1.5. <u>Πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την HPLC-DAD</u>	54

3.1.6. <u>Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για το πρότυπο EN 16109</u>	54
3.1.7. <u>Αραίωση και ρύθμιση του pH</u>	55
3.1.8. <u>Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη</u>	55
3.1.8.1. <i>Πορεία της εκχύλισης με οργανικό διαλύτη</i>	56
3.1.9. <u>Χρωματογραφικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων (Folin-Ciocalteu)</u>	57
3.1.9.1. <i>Αρχή της μεθόδου Folin-Ciocalteu</i>	58
3.1.9.2. <i>Πορεία της μεθόδου Folin-Ciocalteu</i>	59
3.1.9.3. <i>Πρότυπη καμπύλη αναφοράς</i>	60
3.1.10. <u>Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών συστατικών (DPPH•)</u>	61
3.1.10.1. <i>Αρχή της μεθόδου DPPH•</i>	61
3.1.10.2. <i>Πορεία της μεθόδου DPPH•</i>	64
3.1.11. <u>Ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών με HPLC-DAD</u>	64
3.1.11.1. <i>Αρχή μεθόδου της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)</i>	65
3.1.11.2. <i>Χαρακτηριστικά και συνθήκες του χρωματογράφου</i>	65
3.1.11.3. <i>Πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης</i>	66
3.1.12. <u>Προσδιορισμός % των λγγοσουλφονικών (LS), φαινολικών OH και στερεών (πρότυπο EN 16109)</u>	67
3.1.12.1. <i>Προετοιμασία διαλυμάτων</i>	67
3.1.12.2. <i>Φασματοφωτομετρική ανάλυση</i>	67
3.1.12.3. <i>Υπολογισμοί</i>	68
<b>3.2. Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώνσεων</b>	<b>69</b>
3.2.1. <u>Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώνσεις</u>	69
3.2.2. <u>Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώνσεις</u>	70
3.2.3. <u>Μικροοργανισμοί</u>	70
3.2.4. <u>Παρασκευή εμβολίου</u>	71
3.2.5. <u>Θρεπτικά υποστρώματα</u>	71
3.2.5.1. <i>Ασυνεχής καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο το (εκχυλισμένο και μη) απόβλητο CSSL</i>	72
3.2.5.2. <i>Ασυνεχής καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο μίγμα εμπορικών σακχάρων και διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος</i>	72
3.2.6. <u>Αποστείρωση και εμβολιασμός</u>	73
3.2.7. <u>Συνθήκες ζύμωσης διαλείποντος έργου</u>	73
3.2.8. <u>Αναλυτικές μέθοδοι</u>	73
3.2.8.1. <i>Προσδιορισμός και μέτρηση του pH</i>	73
3.2.8.2. <i>Προσδιορισμός κοτταρικής βιομάζας</i>	73

3.2.8.3. Μέθοδος γρήρης χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	74
<b>4. Αποτελέσματα και συζήτηση</b>	<b>75</b>
4.1. Εισαγωγή	75
4.2. Διαχωρισμός και ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών συστατικών	75
4.2.1. <u>Επιλογή του κατάλληλου οργανικού διαλύτη για την εκχύλιση</u>	75
4.2.2. <u>Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών (μέθοδος Folin-Ciocalteu)</u>	78
4.2.3. <u>Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (μέθοδος DPPH•)</u>	81
4.2.4. <u>Ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών με HPLC-DAD</u>	85
4.3. Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων	88
4.3.1. <u>Σάκχαρα που περιέχονται στο απόβλητο CSSL</u>	88
4.3.2. <u>Περιορισμοί και ρύθμιση συνθηκών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης</u>	89
4.3.3. <u>Ζυμώσεις με θρεπτικό υπόστρωμα το απόβλητο CSSL</u>	90
4.3.3.1. <i>Ασυνεχής ζύμωση του αραιωμένου 1:10 CSSL με το βακτήριο B. succiniciproducens</i>	92
4.3.3.2. <i>Ασυνεχής ζύμωση του εκχυλισμένου με χλωροφόρμιο CSSL με το βακτήριο B. succiniciproducens</i>	94
4.3.3.3. <i>Ασυνεχής ζύμωση του εκχυλισμένου με οξικό αιθυλεστέρα CSSL με το βακτήριο B. succiniciproducens</i>	96
4.3.3.4. <i>Ασυνεχής ζύμωση του αραιωμένου 1:10 CSSL με το βακτήριο A. succinogenes</i>	98
4.3.3.5. <i>Ασυνεχής ζύμωση του εκχυλισμένου με χλωροφόρμιο CSSL με το βακτήριο A. succinogenes</i>	99
4.3.3.6. <i>Ασυνεχής ζύμωση του εκχυλισμένου με οξικό αιθυλεστέρα CSSL με το βακτήριο A. succinogenes</i>	101
4.3.4. <u>Σύγκριση των αποτελεσμάτων των ζυμώσεων με θρεπτικό υπόστρωμα το απόβλητο CSSL και χρήση διαφορετικών βακτηρίων</u>	104
4.3.5. <u>Ζυμώσεις με θρεπτικό υπόστρωμα καθαρά σάκχαρα</u>	106
4.3.5.1. <i>Ασυνεχής ζύμωση καθαρών σακχάρων με το βακτήριο A. succinogenes</i>	107
4.3.5.2. <i>Ασυνεχής ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα με προσθήκη γαλλικού οξέος 0,1 g·L<sup>-1</sup> με το βακτήριο A. succinogenes</i>	109
4.3.5.3. <i>Ασυνεχής ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα με προσθήκη γαλλικού οξέος 0,5 g·L<sup>-1</sup> με το βακτήριο A. succinogenes</i>	110
4.3.5.4. <i>Ασυνεχής ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα με προσθήκη γαλλικού οξέος 1 g·L<sup>-1</sup> με το βακτήριο A. succinogenes</i>	112
4.3.5.5. <i>Ασυνεχής ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα με προσθήκη</i>	

<i>γαλλικού οξέος 2 g·L<sup>-1</sup> με το βακτήριο A. succinogenes</i>	<b>114</b>
4.3.6. <u>Σύγκριση των αποτελεσμάτων των ζυμώσεων με θρεπτικό υπόστρωμα μίγμα καθαρών σακχάρων και προσθήκη γαλλικού οξέος</u>	<b>115</b>
<b>5. Συμπεράσματα</b>	<b>121</b>
<b>6. Βιβλιογραφία</b>	<b>124</b>
<b>6.1. Ξένη Βιβλιογραφία</b>	<b>124</b>
<b>6.2. Ελληνική Βιβλιογραφία</b>	<b>137</b>

# 1. Θεωρητικό μέρος

## 1.1. Εισαγωγή

Οι επιπτώσεις της κατανάλωσης ενέργειας από τον άνθρωπο σε παγκόσμιο επίπεδο γίνονται ολοένα και πιο εμφανείς τα τελευταία χρόνια, λόγω του μεγαλύτερου ποσοστού συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) στην ατμόσφαιρα που προκαλείται κυρίως από την αυξημένη χρήση ορυκτών καυσίμων. (Canadell *et al.*, 2007) Η τρέχουσα εκτίμηση των συνολικών αποθεμάτων πετρελαίου είναι  $1,6 \cdot 10^{12}$  βαρέλια και με τα αναφερόμενα επίπεδα κατανάλωσης οι παγκόσμιοι πετρελαϊκοί πόροι θα έχουν εξαντληθεί μέχρι το 2060 (Conti & Doman, 2013). Λόγω της επικείμενης εξάντλησης των ορυκτών πόρων και της καταστροφής του περιβάλλοντος, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στην εύρεση εναλλακτικών βιώσιμων πηγών ενέργειας, οι οποίες αν συνδυαστούν με την ανανεωσιμότητα και το χαμηλό κόστος θα μπορέσουν να λύσουν το ενεργειακό πρόβλημα που δημιουργείται από τη διαρκή αύξηση της τιμής του πετρελαίου και την μείωση των αποθεμάτων του (Koutinas *et al.*, 2014).

Οι βιοδιεργασίες για παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοχημικών ενώσεων έχουν αρχίσει σταδιακά να εφαρμόζονται σε όλο τον κόσμο, και ειδικά στις αναπτυγμένες χώρες και μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για βιώσιμη ανάπτυξη από κοινωνικοοικονομική και περιβαλλοντική σκοπιά. Η αξιοποίηση των παραπροϊόντων ή υποπροϊόντων ή αποβλήτων που παράγονται από διάφορες βιομηχανικές διεργασίες κρίνεται πλέον απαραίτητη με απώτερο σκοπό την αντικατάσταση χημικών ουσιών και καυσίμων που έχουν ως βάση τους το πετρέλαιο. Πρώτο βήμα στην αξιοποίηση αυτών των ρευμάτων των αποβλήτων είναι ο μετασχηματισμός των υπάρχουσων βιομηχανιών σε ολοκληρωμένα και αειφόρα βιοδιυλιστήρια (Koutinas *et al.*, 2014).

Ο κλάδος της βιομηχανίας παραγωγής χαρτοπολτού και χάρτου παρουσιάζει σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, τόσο από την άποψη της κατανάλωσης φυσικών πόρων και ενέργειας όσο και από την άποψη των εκλυόμενων ρύπων (European Commission, 2011). Σήμερα, ειδικά σε περιοχές που έχουν επιδείξει σημαντική ανάπτυξη και εκσυγχρονισμό του συγκεκριμένου κλάδου της βιομηχανίας έχει επιτευχθεί ο έλεγχος και η σημαντική μείωση των περιβαλλοντικών επιβαρύνσεων. Παρ' όλα αυτά, τα περιβαλλοντικά ζητήματα από τη λειτουργία των χαρτοβιομηχανιών παραμένουν πολύ σημαντικά (Asghar *et al.*, 2008). Η βιομηχανία χάρτου και χαρτοπολτού βρίσκεται στο επίκεντρο της ιδέας του «δασικού βιοδιυλιστηρίου». Για την ακρίβεια, τα μοναδικά προϊόντα των υπάρχοντων βιομηχανικών μονάδων είναι ο χαρτοπολτός και το χαρτί, αλλά είναι δυνατόν να

ενσωματωθούν και άλλες διαδικασίες που να προσφέρουν ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα (Mendes *et al.*, 2009).

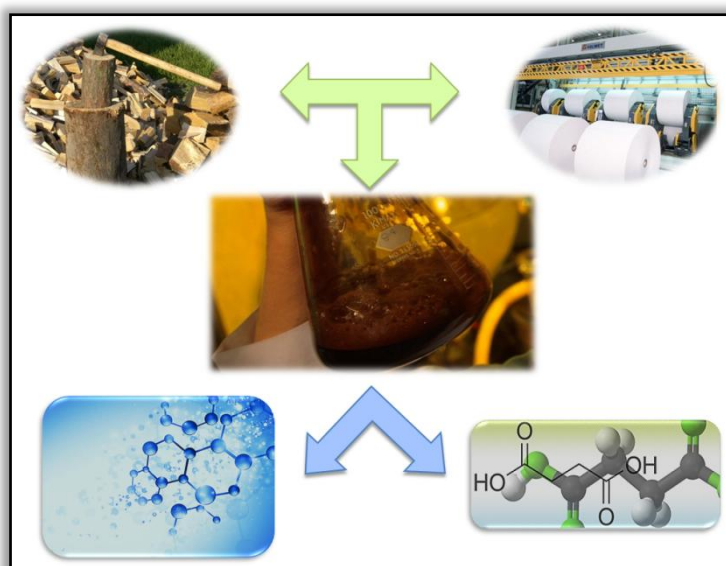
Το υγρό απόβλητο της βιομηχανίας παραγωγής χαρτοπολτού και χαρτιού SSL (spent sulphite liquor) και το συμπύκνωμα αυτού CSSL (Concentrated Spent Sulphite Liquor), που αποκτάται από την εξάτμιση του SSL πριν την καύση του στο λέβητα ανάκτησης, είναι από τα κύρια υγρά παραπροϊόντα κατά τη διαδικασία παραγωγής του χαρτοπολτού με την όξινη θειώδη μέθοδο πολτοποίησης (Marques *et al.*, 2009). Η επεξεργασία των αποβλήτων με υψηλό οργανικό φορτίο, SSL ή CSSL, είναι μια αναγκαία διαδικασία από τεχνική και περιβαλλοντική άποψη (Llano *et al.*, 2012). Απαιτούνται προχωρημένες προσεγγίσεις για να παραχθούν προϊόντα προστιθεμένης αξίας από SSL ή CSSL, ώστε να αμβλυνθούν οι περιβαλλοντικές ανησυχίες και να βελτιωθεί η αειφορία των βιομηχανιών χαρτοπολτού που χρησιμοποιούν την μέθοδο των θειωδών (Evtuyugin *et al.*, 2010).

Η πλούσια σύσταση του αποβλήτου CSSL σε μονοσακχαρίτες, κυρίως ξυλόζη και σε μικρότερες ποσότητες γαλακτόζη, μαννόζη, γλυκόζη και αραβινόζη, (Marques *et al.*, 2009) το καθιστά κατάλληλο για την παραγωγή χημικών ενώσεων μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Υπάρχουν πολλές χημικές ουσίες που μπορούν να παραχθούν με ζύμωση από ανανεώσιμες πηγές και μια από αυτές είναι το ηλεκτρικό οξύ, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παραχθεί ένα ευρύ φάσμα προϊόντων, όπως πολυμερή, τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά (Song & Lee, 2006). Ωστόσο, η υψηλή συγκέντρωση των παρεμποδιστικών παραγόντων στο CSSL έχει ως αποτέλεσμα χαμηλές αποδόσεις των παραγόμενων προϊόντων μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Έτσι, όλο και αυξανόμενος αριθμός επιστημόνων επικεντρώνεται στην μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και ερευνούν τον τρόπο βελτίωσης της παραγωγικότητας επιλέγοντας τον κατάλληλο μικροοργανισμό, το μέσο ζύμωσης και τις συνθήκες της διαδικασίας της ζύμωσης (Koutinas *et al.*, 2014).

Επιπλέον, το απόβλητο CSSL, ως λιγνοκυτταρινούχο απόβλητο, μπορεί να διαχωριστεί σε κλάσματα διαφορετικής χημικής φύσεως για την παραγωγή εύρους εμπορικών ενώσεων. Έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς η αφαίρεση φαινολικών συστατικών από διάφορα λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα με εκχύλιση (Parajó *et al.*, 2008). Το διάλυμα που περιέχει τα σάκχαρα, απαλλαγμένο από μέρος παρεμποδιστικών ουσιών, μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για μικροβιακή παραγωγή διαφόρων χημικών ενώσεων, όπως αιθανόλη (Delgenes *et al.*, 1996; Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996; Sun & Cheng, 2002), 2,3-βουτανοδιόλη (Frazer & McCaskey, 1991; Kim *et al.*, 2014), ξυλιτόλη (Parajó *et al.*, 1997; Villarreal *et al.*, 2006) και ηλεκτρικό οξύ (Hodge *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2004; Koutinas *et al.*, 2014). Ενώ, οι φαινολικές ενώσεις του εκχυλίσματος, που προέρχονται από αποπολυμερισμό της λιγνίνης μπορούν να χαρακτηριστούν ότι έχουν φυσική προέλευση, δομή και

σύνθεση, και έχουν προταθεί ως αντιοξειδωτικά, χαρακτηρισμός ο οποίος προσθέτει εμπορική αξία στο παραπροϊόν (Parajo *et al.*, 2008).

Δισεκατομμύρια λίτρα του αποβλήτου CSSL παράγονται ετησίως σε όλο τον κόσμο (CEPI Key Statistics, 2012; CEPI Key Statistics, 2013; Koutinas *et al.*, 2014). Λαμβάνοντας σοβαρά υπόψη τις υπέρογκες παραγόμενες ποσότητες αυτού του αποβλήτου κρίνεται αναγκαία και ζωτικής σημασίας η αξιοποίησή του. Η ταυτόχρονη παραγωγή υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντων, όπως είναι τα φαινολικά συστατικά, αλλά και η μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, μιας ένωσης που οδηγεί στην παραγωγή ενός μεγάλου εύρους χημικών ουσιών που μπορούν να αντικαταστήσουν προϊόντα που παράγονται από το πετρέλαιο, θα μπορούσε να μετατρέψει το απόβλητο CSSL σε ένα ακόμη «προϊόν» της βιομηχανίας χαρτοπολτού και χάρτου επιφέροντας βιωσιμότητα και αειφορία στη βιομηχανία (εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Αξιοποίηση του αποβλήτου CSSL της χαρτοβιομηχανίας

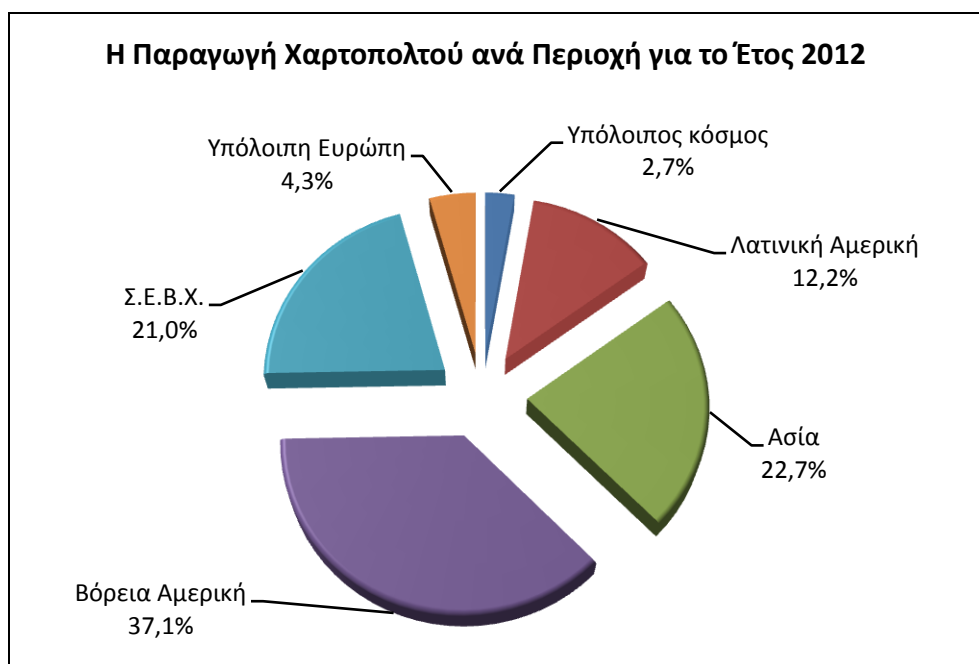
## 1.2. Το απόβλητο CSSL της βιομηχανίας χαρτοπολτού και χάρτου

### 1.2.1. Η ετήσια παραγωγή χαρτοπολτού

Η παγκόσμια παραγωγή χαρτοπολτού για το έτος 2012 ήταν  $181,6 \cdot 10^6$  τόνοι (CEPI Key Statistics, 2013). Η Βόρεια και Λατινική Αμερική παράγει  $89,5 \cdot 10^6$  τόνους, δηλαδή, περίπου το 50% επί του συνόλου, ενώ η Ευρώπη την ακολουθεί με

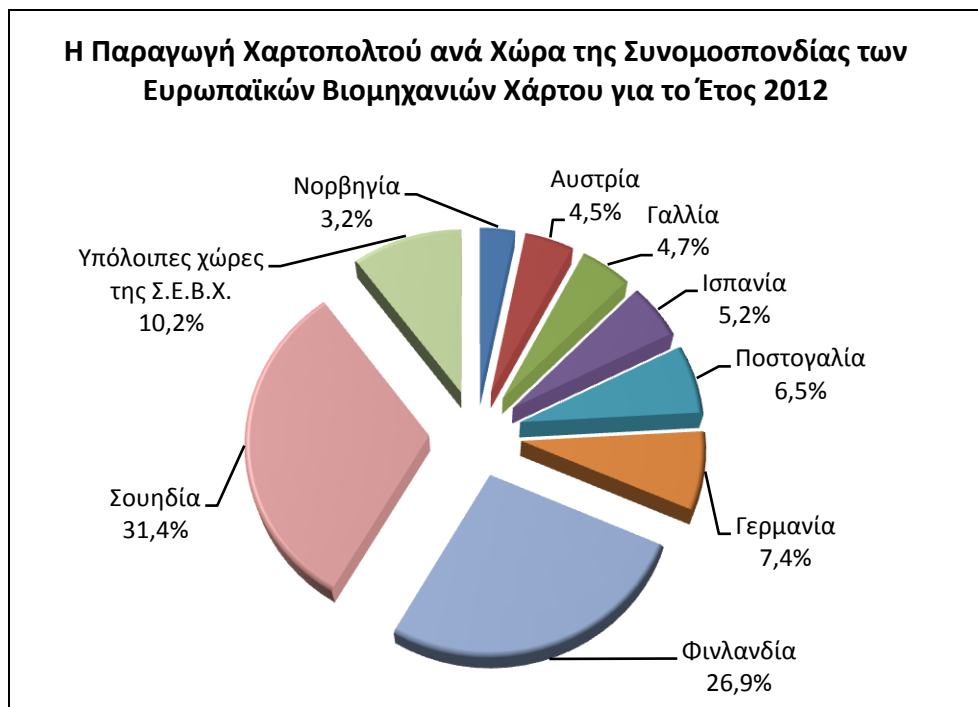


παραγωγή  $45,9 \cdot 10^6$  τόνων και τέλος η Ασία παράγει  $41,2 \cdot 10^6$  τόνους χαρτοπολτού (γράφημα 1.1).



Γράφημα 1.1: Ετήσια παγκόσμια παραγωγή χαρτοπολτού ανά περιοχή για το έτος 2012 (CEPI Key Statistics, 2013)

Στην Ευρώπη έχει ιδρυθεί από το 1992 η Συνομοσπονδία των Ευρωπαϊκών Βιομηχανιών Χάρτου - Σ.Ε.Β.Χ. (Confederation of European Paper Industry - CEPI), η οποία απαρτίζεται από 18 χώρες, την Αυστρία, το Βέλγιο, τη Τσεχική Δημοκρατία, τη Φινλανδία, τη Γαλλία, τη Γερμανία, την Ουγγαρία, την Ιταλία, την Ολλανδία, τη Νορβηγία, την Πολωνία, την Πορτογαλία, την Ρουμανία, τη Σλοβακία, τη Σλοβενία, την Ισπανία, την Σουηδία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Το 21% της παγκόσμιας παραγωγής χαρτοπολτού για το έτος 2012 παράχθηκε από την Σ.Ε.Β.Χ. Στο *γράφημα 1.2* παρουσιάζεται η ετήσια παραγωγή χαρτοπολτού ανά χώρα που ανήκει στη Σ.Ε.Β.Χ. με τη Σουηδία και τη Φινλανδία να παράγουν και οι δύο μαζί  $22,2 \cdot 10^6$  τόνους χαρτοπολτού (CEPI Key Statistics, 2012; CEPI Key Statistics, 2013).



*Γράφημα 1.2: Ετήσια παραγωγή χαρτοπολτού ανά χώρα της Σ.Ε.Β.Χ. για το έτος 2012 (CEPI Key Statistics, 2012)*

### 1.2.2. Η όξινη θειώδης πολτοποίηση

Όλες οι διεργασίες που χρησιμοποιούνται για την πολτοποίηση του ξύλου για την παραγωγή προϊόντων χάρτου έχουν τον ίδιο στόχο. Να ελευθερώσουν τις ίνες κυτταρίνης από την λιγνίνη που τις περιβάλλει, ενώ θα κρατήσουν τις ημικυτταρίνες και την κυτταρίνη άθικτες, ώστε να αυξηθεί η απόδοση σε χρήσιμες ίνες. Ο χαρτοπολτός χωρίζεται σε δύο κύριες μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής του, σε χημική χαρτόμαζα και σε μηχανική χαρτόμαζα (Sidiras & Koukios, 2004). Η χημική πολτοποίηση είναι πολύ πιο διαδεδομένη από την μηχανική και η χρήση της αποτελεί το 75,6% της χρήσης όλων των υπόλοιπων μεθόδων (Koutinas *et al.*, 2014).

Με τη μηχανική μέθοδος ο πολτός παράγεται με συμπίεση και τριβή της πρώτης ύλης πάνω σε περιστρεφόμενους κυλίνδρους ή δίσκους, έτσι ώστε οι ίνες να διαχωριστούν μεταξύ τους μηχανικά, χωρίς καμιά μεταβολή στη χημική σύσταση. Αντιθέτως, μέσω της χημικής πολτοποίησης επιδιώκεται η απελευθέρωση των ινών της κυτταρίνης με τον ελάχιστο δυνατό τραυματισμό τους. Αυτό επιτυγχάνεται με κατάλληλες χημικές αντιδράσεις, οι οποίες διαλύουν και απομακρύνουν τη συνδετική ύλη μεταξύ των ινών (κυρίως τη λιγνίνη). Ο χημικός χαρτοπολτός είναι χαρτοπολτός

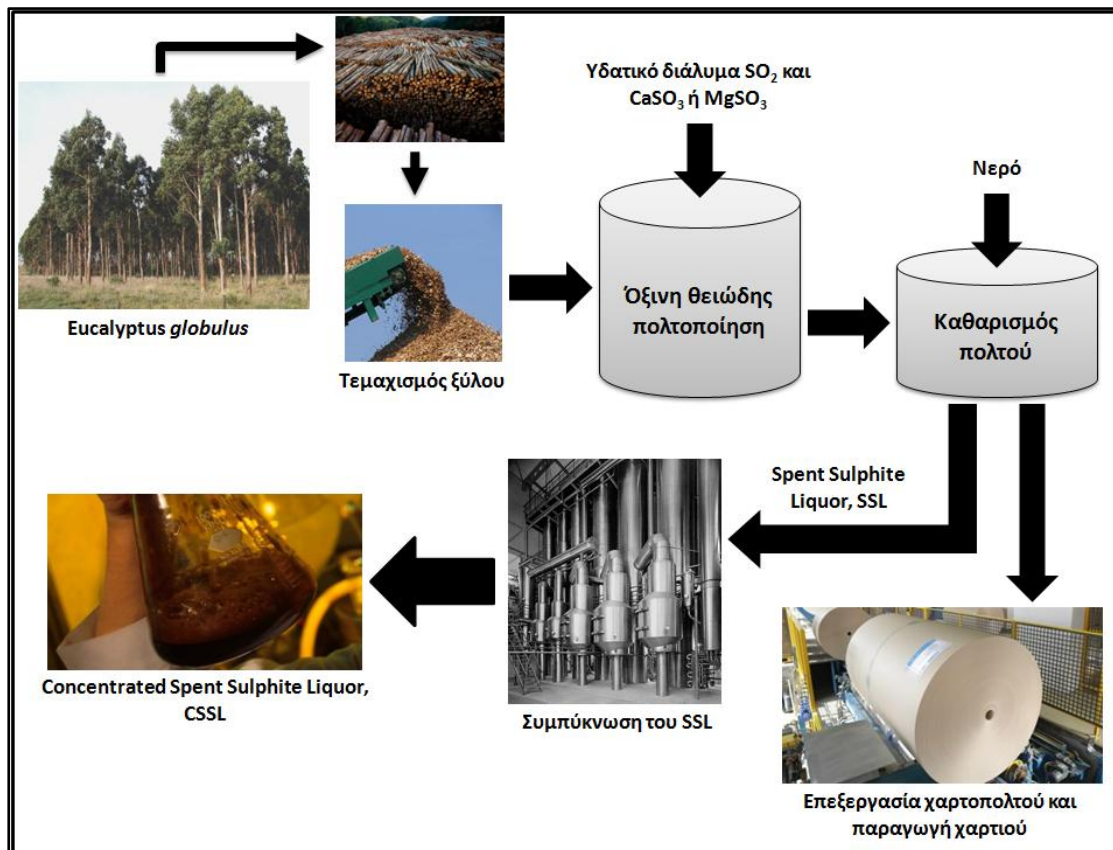
χαμηλής απόδοσης, επειδή στις διάφορες μεθόδους χημικής πολτοποίησης η απόδοση του ξύλου σε ίνες είναι 40-60%. Η χημική χαρτόμαζα έχει, όμως, καλύτερες οπτικές ιδιότητες και πολύ μεγαλύτερη μηχανική αντοχή από τη μηχανική, επειδή αποτελείται από μακρύτερες και περισσότερο εύκαμπτες ίνες. Τα πλεονεκτήματα αυτά οφείλονται στον μικρότερο μηχανικό τραυματισμό των ινών και στην απομάκρυνση μεγάλου ποσοστού λιγνίνης κατά τη χημική πολτοποίηση (Roberts, 1996; Φιλιππακοπούλου, 2009).

Ανάλογα με τη σύσταση του διαλύματος πολτοποίησης, διακρίνονται δύο βασικές μέθοδοι χημικής πολτοποίησης: (1) η αλκαλική μέθοδος, όπου την κυριότερη εκπρόσωπο αυτής συνιστά η μέθοδος τωνθειικών (ή, αλλιώς, μέθοδος kraft), και (2) η όξινη μέθοδος, η μέθοδος τωνθειωδών. Στην πρώτη μέθοδο το διάλυμα της πολτοποίησης περιέχει υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) καιθειούχο νάτριο (Na<sub>2</sub>S), ενώ στη δεύτερη το διάλυμα συνήθως περιέχειθειώδες ασβέστιο (CaSO<sub>3</sub>) ήθειώδες μαγνήσιο (MgSO<sub>3</sub>). Η μέθοδος kraft, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 80% της παγκόσμιας παραγωγής χαρτοπολτού είναι η πιο εφαρμοσμένη μέθοδος παραγωγικής διεργασίας χημικής πολτοποίησης. Η χρήση της μεθόδου τωνθειωδών μειώθηκε και σήμερα μόνο το 10% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής ακολουθεί τη μέθοδο αυτή (European Commission, 2013; Koutinas *et al.*, 2014).

Η μέθοδος τωνθειωδών αποτελούσε την κύρια μέθοδο χημικής πολτοποίησης κατά την περίοδο από το 1890 έως το 1930, οπότε και άρχισε να αντικαθίσταται από τηθειική μέθοδο. Ενώ το 1960 ηθειώδης μέθοδος αποτελούσε το 20% της παγκόσμιας παραγόμενης χαρτόμαζας, σήμερα αυτή η μέθοδος έχει μικρή διάδοση, όμως συνεχίζει να εφαρμόζεται εξαιτίας της ελαστικότητάς της ως προς τις συνθήκες κατεργασίας και επειδή παράγει ανοιχτόχρωμη χαρτόμαζα, η οποία λευκαίνεται ευκολότερα από τηθειική. Οι κυριότερες μονάδες παραγωγήςθειωδους χαρτόμαζας βρίσκονται στις ΗΠΑ, στη Σουηδία και στη Γερμανία (Φιλιππακοπούλου, 2009).

Τα κύρια στάδια της μεθόδου τωνθειωδών με πρώτη ύλη το ξύλο του πλατύφυλλου και αειθαλούς δέντρου *Eucalyptus globulus* («σκληρή ξυλεία»-hardwood) φαίνονται στην *εικόνα 1.2*. Η προετοιμασία πριν την πολτοποίηση περιλαμβάνει την κοπή των κορμών σε κατάλληλο μήκος, την αποφλοιώση τους, δηλαδή απομάκρυνση του φλοιού του δέντρου, τη μετατροπή σε ξυλοτεμαχίδια (chips) και την αποθήκευσή τους. Στη συνέχεια, τα ξυλοτεμαχίδια υφίστανται κατεργασία μέσα σε ειδικά χωνευτήρια σε συνθήκες ισχυρά όξινες (pH: 1-2), με υδατικό διάλυμα SO<sub>2</sub> και προσθήκη CaSO<sub>3</sub> ή MgSO<sub>3</sub>, σε θερμοκρασία από 135 °C έως 140 °C και πίεση από 4 μέχρι 6 atm. Κατά τη διεργασία αυτή διαλύεται η λιγνίνη και το ξύλο αποϊνώνεται με απότομη μείωση της πίεσης (εκτόνωση) μετά την έξοδο των ξυλοτεμαχιδίων από το χωνευτήριο. Ο πολτός που σχηματίζεται απαιτεί μεγάλες ποσότητες νερού ώστε να αφαιρεθούν όλες οι προσμίξεις, όπως τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και οι διαλυτές οργανικές ουσίες. Ο πολτός

μετά τον καθαρισμό με νερό υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία προς παραγωγή προϊόντων χάρτου. Το ρεύμα με τις προσμίξεις που προκύπτει, ονομάζεται θειώδες υγρό (SSL) και περιέχει περισσότερο από 50% ουσίες που προέρχονται από το ξύλο, τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη, και διάφορα υδατοδιαλυτά ανόργανα άλατα από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν (Koutinas *et al.*, 2014; Φιλιππακοπούλου, 2009).



Εικόνα 1.2: Παραγωγική διαδικασία χαρτοπολτού με την όξινη θειώδη μέθοδο

Το SSL χαρακτηρίζεται ως παραπροϊόν, και τα περίπου 8-9  $\text{m}^3$  που παράγονται αντιστοιχούν σε 1 τόνο παραγόμενου χαρτοπολτού. Τα ολικά στερεά που περιέχονται στο απόβλητο αυτό αποτελούν το 10 με 20% w/v του SSL. Μέσω πολυβάθμιου συστήματος εξάτμισης το παραπροϊόν συμπυκνώνεται, ώστε να αυξηθεί η περιεκτικότητα των ολικών στερεών σε 60 με 75% w/v, και προκύπτει το συμπυκνωμένο θειώδες υγρό CSSL (Koutinas *et al.*, 2014).

### 1.2.3. Το συμπυκνωμένο απόβλητο CSSL της χαρτοβιομηχανίας

Περίπου  $116,7 \cdot 10^9$  L αποβλήτου SSL ή  $25,9 \cdot 10^9$  L αποβλήτου CSSL παράγονται ετησίως σε όλο τον κόσμο (CEPI Key Statistics, 2012; CEPI Key Statistics, 2013; Koutinas *et al.*, 2014) και περιέχουν σημαντικά ποσά διαλυμένης οργανικής ουσίας ( $COD > 100000 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  για το SSL). Δεν μπορεί να διατεθεί κανένα από τα δύο αυτά απόβλητα σε φυσικούς κόλπους λόγω της ρύπανσης του περιβάλλοντος που προκαλεί η διάθεσή τους, για το λόγο αυτό και πρέπει να υποβληθούν σε επεξεργασία. Στην περίπτωση του SSL που χρησιμοποιείται  $\text{CaSO}_3$ , αυτό συμπυκνώνεται με εξάτμιση και εμπορευματοποιείται στην αρχική του μορφή. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται  $\text{MgSO}_3$  ένα σημαντικό μέρος από το συμπυκνωμένο πυκνό υγρό απόβλητο CSSL καίγεται για την ανάκτηση του αντιδραστηρίου και ενέργειας, αν και μέρος του υγρού αυτού αποβλήτου μπορεί και να εμπορευτεί ως έχει (Evtuyugin *et al.*, 2010).

Το εύρος των χρήσεων και των τρόπων επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων της μεθόδου των θειωδών εξαρτάται κυρίως από τη χημική σύσταση, η οποία καθορίζεται από την προέλευση του ξύλου που χρησιμοποιείται στη διαδικασία πολτοποίησης. Η συγκέντρωση των διαφορετικών ενώσεων που περιέχει το CSSL εξαρτάται επίσης από το βαθμό εξάτμισης που θα πραγματοποιηθεί και τις συνθήκες της πολτοποίησης, όπως π.χ. την τιμή της θερμοκρασίας και την ποσότητα του  $\text{SO}_2$ . Στον πίνακα 1.1 γίνεται βιβλιογραφική αναφορά σε πέντε διαφορετικές μελέτες για τη χημική σύσταση των αποβλήτων SSL και CSSL, που προέρχονται από όξινη θειώδη πολτοποίηση του *E.globulus* με  $\text{SO}_2$  και  $\text{MgSO}_3$ . Στην περίπτωση της μελέτης των Llano *et al.* (2012) έχει χρησιμοποιηθεί δολομίτης αντί για  $\text{MgSO}_3$ . Όπως φαίνεται για το πυκνό απόβλητο CSSL δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα πολλές αναφορές (Fernandes *et al.*, 2012; Llano *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2009; Restolho *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2010).

Τα απόβλητα SSL και CSSL περιέχουν λιγνοσουλφονικά, σάκχαρα, οξικό οξύ, φουρφουράλη, φαινολικές ενώσεις, διάφορα βαρέα μέταλλα και άλλες ουσίες οι οποίες προέρχονται από το ξύλο. Τα σημαντικά ποσά σακχάρων που περιέχουν τα απόβλητα αυτά θεωρούνται μη επιθυμητές προσμίξεις για πολλές εφαρμογές, όπως για πρόσθετα σε σκυρόδεμα και τσιμέντο, παράγοντες προσκόλλησης σε οξειδωτικές συνθέσεις, κ.ά. Ως εκ τούτου, η απομάκρυνση των σακχάρων από το SSL πριν τη συμπύκνωσή τους μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό παράγοντα από τον οποίο εξαρτάται η επιτυχής πώληση του CSSL. Από την άλλη, η βιοχημική επεξεργασία του CSSL που προέρχεται από την πολτοποίηση «μαλακής ξυλείας» (ξύλο κωνοφόρων-softwood) είναι μια κοινή βιομηχανική διεργασία, ενώ η βιοχημική επεξεργασία του CSSL που προέρχεται από τη θειώδη πολτοποίηση «σκληρής

ξυλείας» (ξύλο πλατύφυλλων-hardwood) δεν έχει μελετηθεί ακόμα εκτενώς (Pereira *et al.*, 2013; Restolho *et al.*, 2009).

Πίνακας 1.1: Βιβλιογραφική αναφορά για τη χημική σύσταση των αποβλήτων SSL και CSSL

Ανάλυση των αποβλήτων SSL και CSSL						
	Marques <i>et al.</i> , 2009	Marques <i>et al.</i> , 2009	Restolho <i>et al.</i> , 2009	Xavier <i>et al.</i> , 2010	Fernandes <i>et al.</i> , 2012	Llano <i>et al.</i> , 2012
	CSSL	SSL				
<b>pH</b>	3,7	2,9	3,0-3,7	3,4	3,3	-
<b>Πυκνότητα (g·mL<sup>-1</sup>)</b>	1,48	1,18	-	-	1,08	1,07-1,08
<b>Ξηρή Βάρος (g·L<sup>-1</sup>)</b>	841	151	161-173	148	171	121-165
<b>Λιγνοσουλφονικά (g·L<sup>-1</sup>)</b>	487	70	79-87	78	130	106-211
<b>Τέφρα (g·L<sup>-1</sup>)</b>	204	33	-	20	16	20-64
<b>Εκχυλίσματα (g·L<sup>-1</sup>)</b>	4,5	1	-	-	1,6	-
<b>Σάκχαρα (g·L<sup>-1</sup>)</b>	134	38	40-58	50	54	31-57
<b>Ξυλόζη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	81	25	-	25	40	-
<b>Γαλακτόζη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	31	6	-	5	4	-
<b>Γλυκόζη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	10	3,5	-	2	4	-
<b>Μαννόζη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	4,5	1	-	8	2	-
<b>Αραβινόζη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	4,5	1	-	8	2	-
<b>Ραμνόζη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	3	1	-	2	2	-
<b>Οξικό οξύ (g·L<sup>-1</sup>)</b>	4,5	9,5	-	8	11	8-15
<b>Φουρφοουράλη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	<0,1	2	-	<0,1	1	-

Πιο αναλυτικά, το πυκνό υγρό αποβλήτο CSSL από την όξινη θειώδη μέθοδο πολτοποίησης από ξύλο *E. globulus* περιέχει τρία κύρια μη πτητικά υλικά: σάκχαρα,

λιγνοσουλφονικά και τέφρα. Το CSSL περιέχει αξιοσημείωτη αναλογία υδατανθράκων (περίπου το 16% της ξηρής μάζας), που είναι κυρίως πεντόζες (περίπου το 70% των ολικών σακχάρων). Συγκεκριμένα το απόβλητο περιέχει τις πεντόζες, ξυλόζη και αραβινόζη, και τις εξόζες, γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη. Κατά τη διάρκεια της εξάτμισης του SSL, μια σημαντική αναλογία πεντοζών (σχεδόν η μισή) αποικοδομείται σε φουρφουράλη και σε συμπυκνωμένα προϊόντα της. Το γεγονός αυτό εξηγεί την μη ισορροπία μεταξύ των πεντοζών στο SSL και CSSL και όσον αφορά την τιμή της συγκέντρωσης ξηρής μάζας του SSL που είναι μικρότερη περίπου 4,4 φορές από αυτή του CSSL (Marques *et al.*, 2009).

Τα λιγνοσουλφονικά είναι το πιο άφθονο οργανικό κλάσμα στα υγρά απόβλητα θειώδους πολτοποίησης (το 50% του υγρού αποβλήτου CSSL σε ξηρή μάζα) αποτελούμενο από σουλφονικά oligομερή ( $\text{SO}_3\text{H} \approx 20\%$  w/w). Όταν το ξύλο προέρχεται από πλατύφυλλο δέντρο ο τύπος της λιγνίνης είναι S και G (syringyl- και guaiacyl- μονάδες λιγνίνης) και η αναλογία S προς G έχει βρεθεί να είναι 81:19. Όμως, κυρίως μικρού μοριακού βάρους λιγνοσουλφονικά βρέθηκαν να περιέχονται στο CSSL. Το γεγονός αυτό εξηγείται από τον εκτεταμένο αποπολυμερισμό της λιγνίνης που περιέχεται στο ξύλο *E. globulus* κατά τη διάρκεια της όξινης θειώδους επεξεργασίας του ξύλου. (Evtuyugin *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2013).

Τέλος, μεταξύ των πτητικών ενώσεων το οξικό οξύ και η φουρφουράλη είναι τα πιο άφθονα. Αξιοσημείωτη περιεκτικότητα οξικού οξέος παραμένει στο CSSL μετά την εξάτμιση του SSL. Επιπλέον, ορισμένη ποσότητα οξικού οξέος σχηματίζεται λόγω της αποακετυλίωσης των διαλυμένων ξυλο-ολιγοσακχαριτών, αφού η κύρια πηγή οξικού οξέος είναι η ακετυλιωμένη γλυκουρονοξυλάνη (Evtuyugin *et al.*, 2010).

#### 1.2.4. Αξιοποίηση των αποβλήτων SSL/CSSL της χαρτοβιομηχανίας μέσω ζύμωσης

Η βιομηχανία χαρτοπολτού και χάρτου μπορεί να αναβαθμιστεί σε προηγμένο βιοδιυλιστήριο παράγοντας μια ποικιλία προϊόντων από την αξιοποίηση του υγρού θειώδους αποβλήτου της, SSL, ή του συμπυκνωμένου CSSL. Αν και, οι ίνες της κυτταρίνης αποτελούν το κύριο προϊόν της βιομηχανίας χαρτοπολτού, από τα υγρά απόβλητα SSL και CSSL μπορούν να παραχθούν διάφορα «συν-προϊόντα», όπως λιγνοσουλφονικά ή λιγνίνη, φαινολικές ενώσεις ως αντιοξειδωτικά και χημικές ενώσεις από την βιομετατροπή των πεντοζών και εξοζών που περιέχουν.

Αρκετές έρευνες έχουν διεξαχθεί εξετάζοντας την αξιοποίηση των σακχάρων που περιέχονται στο SSL για την παραγωγή και τη βελτιστοποίηση της παραγωγής βιοαιθανόλης. Ωστόσο, αυτό το υγρό απόβλητο περιέχει διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες, όπως οξικό οξύ, φουρφουράλη, λιγνοσουλφονικά και φαινολικές ενώσεις οι

οποίες δρουν ως αναστολείς της μικροβιακής ανάπτυξης και ως εκ τούτου είναι συνήθως απαραίτητο ένα στάδιο προεπεξεργασίας πριν από την ζύμωση. Οι τυπικές αποδόσεις παραγωγής αιθανόλης με ζύμωση του προεπεξεργασμένου SSL με χρήση του γενετικά τροποποιημένου βακτηρίου *Escherichia coli* (Lawford & Rousseau, 1993) και του ζυμομύκητα *Pichia stipitis* (Xavier *et al.*, 2010) έχουν εύρος τιμών 0,3 έως 0,48 g·g<sup>-1</sup> και η τελική συγκέντρωση της αιθανόλης κυμαίνεται από 5 έως 18 g·L<sup>-1</sup>.

Η χρήση των SSL και CSSL για παραγωγή χημικών ενώσεων και βιοπολυμερών δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Θα μπορούσε όμως να υιοθετηθεί η έρευνα που έχει ήδη πραγματοποιηθεί για τη ζύμωση των προϊόντων της όξινης υδρόλυσης του ξύλου για παραγωγή χημικών και στην περίπτωση των αποβλήτων της χαρτοβιομηχανίας (Koutinas *et al.*, 2014). Οι Frazer *et al.* (1989) ανέφεραν ότι με τη χρήση επεξεργασμένου όξινου υδρολύματος ξύλου παράχθηκαν 19,1 g·L<sup>-1</sup> 2,3-βουτανοδιόλης με απόδοση 0,48 g·g<sup>-1</sup> και παραγωγικότητα 0,2 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> όταν χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae*. Επεξεργασμένο όξινο υδρόλυμα ξύλου έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την παραγωγή 32,7 g·L<sup>-1</sup> ξυλιτόλης από το ζυμομύκητα *Candida guilliermondii* (Villarreal *et al.*, 2006). Τέλος, η βακτηριακή παραγωγή κυτταρίνης (0,75 g·L<sup>-1</sup>) αξιολογήθηκε πρόσφατα χρησιμοποιώντας το βιομηχανικής προέλευσης υγρό απόβλητο SSL από όξινη θειώδη πολτοποίηση του ξύλου *E. globulus* (Carreira *et al.*, 2011).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε το συμπυκνωμένο υγρό απόβλητο CSSL (Concentrated Spent Sulphite Liquor) το οποίο προήλθε από την όξινη θειώδη μέθοδο πολτοποίησης του ξύλου *E. globulus*. Το απόβλητο αυτό περιείχε υψηλή συγκέντρωση σακχάρων (176,4 g·L<sup>-1</sup>), κυρίως ξυλόζης (Pateraki *et al.*, 2013), και σημαντική ποσότητα φαινολικών ουσιών (12 g·L<sup>-1</sup>), όπως αναλύθηκε βάσει του προτύπου EN 16109 στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Για το διαχωρισμό των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε επεξεργασία του αποβλήτου παρόμοια με αυτή που πραγματοποίησαν οι ερευνητές Cruz *et al.* (2005) σε όξινο υδρόλυμα του ξύλου *E. globulus*. Το επεξεργασμένο απόβλητο στη συνέχεια αποτέλεσε θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω ζύμωσης με χρήση βακτηρίων.

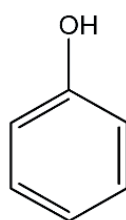


### 1.3. Φαινολικά συστατικά, τα φυσικά αντιοξειδωτικά

#### 1.3.1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια έχει διαμορφωθεί η αντίληψη ότι οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν τη σπουδαιότερη κατηγορία αντιοξειδωτικών που απαντούν σε τρόφιμα (Pokorny *et al.*, 2001; Shahidi, 2000). Ανήκουν στην κατηγορία των φυσικών αντιοξειδωτικών, αποτελούν άφθονο συστατικό των φυτών και βρίσκονται συνήθως στο κενοτόπιο των φυτικών κυττάρων. Τα φυτά παράγουν φαινολικές ενώσεις ως δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού τους, κυρίως μέσω των μεταβολικών μονοπατιών του σικιμικού οξέος και του φαινυλοπροπανίου. Αντιπροσωπεύουν μεγάλη ομάδα μορίων και είναι απαραίτητα συστατικά της φυσιολογίας των φυτών, καθώς εμπλέκονται στην ανάπτυξη, στην παραγωγή τους, στη μορφολογία τους και προστατεύουν τα φυτά από έντομα, μύκητες, βακτήρια και ιούς (Bravo, 1998; Vermerris & Nicholson, 2008). Τα φαινολικά είναι τόσο διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο που πρακτικά είναι αδύνατο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν όλα τα μέλη των φαινολικών ενώσεων που απαντούν στη φύση (Cheynier, 2005).

Με τον όρο «φαινολικές ενώσεις» ορίζονται οι ενώσεις που έχουν μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου το οποίο συνδέεται απευθείας σε έναν αρωματικό δακτύλιο. Στην *εικόνα 1.3* φαίνεται η δομή της φαινόλης πάνω στην οποία βασίζεται ολόκληρη η τάξη των φαινολικών ενώσεων. Ο αρωματικός δακτύλιος στην περίπτωση αυτή είναι, φυσικά, το βενζόλιο (Vermerris & Nicholson, 2008).



*Εικόνα 1.3: Δομή του μορίου της φαινόλης (Vermerris & Nicholson, 2008)*

Η φαινολική ομάδα υδροξυλίου επηρεάζεται από την παρουσία του αρωματικού δακτυλίου και το υδρογόνο του φαινολικού υδροξυλίου είναι ασταθές, γεγονός που καθιστά τις φαινόλες ασθενή οξέα (Vermerris & Nicholson, 2008). Οι φαινολικές ενώσεις, που συναντώνται στα φυτά μπορεί να υπάρχουν σαν απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, αλλά και ως μεγάλου μοριακού βάρους

πολυμερισμένες ενώσεις (πολυφαινόλες), όπως είναι οι ταννίνες (Bravo, 1998). Οι πολυφαινόλες είναι ενώσεις που έχουν περισσότερες από μία φαινολικές ομάδες υδροξυλίου συνδεδεμένες με έναν ή περισσότερους δακτυλίους βενζολίου (Vermerris & Nicholson, 2008).

Οι φαινολικές ενώσεις απαντούν στη φύση συνήθως συζευγμένες μέσω εστερικών, αιθερικών ή ακεταλικών δεσμών κυρίως με σάκχαρα και οργανικά οξέα, (γλυκόζη, τρυγικό οξύ, κ.ά). (Heim *et al.*, 2002). Μόνο πολύ μικρό ποσοστό τους απαντάται σε ελεύθερη μορφή πιθανώς λόγω αυξημένης δραστηριότητας η οποία αποδίδεται σε δυνατότητα ιονισμού των φαινολικών υδροξυλομάδων και μεταφοράς πρωτονίων. Επιπλέον, οι συζευγμένες μορφές αυτών των μεταβολιτών είναι περισσότερο υδατοδιαλυτές, συγκρατούνται καλύτερα σε ενδοκυτταρικά σωματίδια ενώ ανάλογα με το είδος τους φαίνεται να επηρεάζουν και τη βιοδιαθεσιμότητα των ενώσεων που απαντούν σε εδώδιμα φυτά (Parr & Boldwell, 2000).

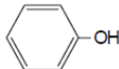
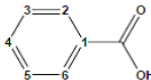
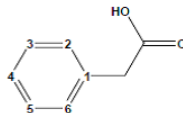
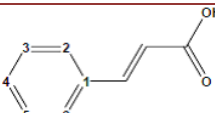
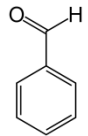
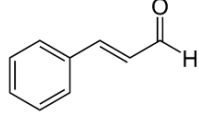
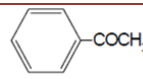
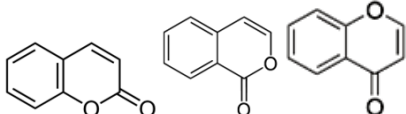
### 1.3.2. Δομή και κατηγορίες φαινολικών ενώσεων

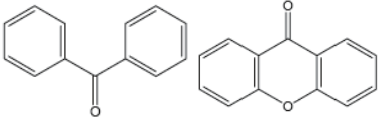
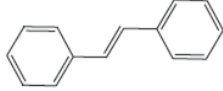
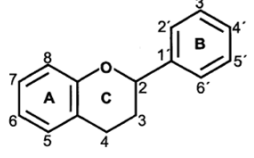
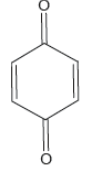
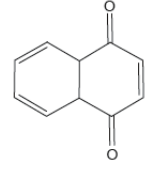
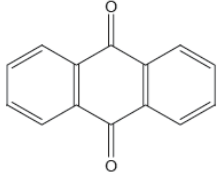
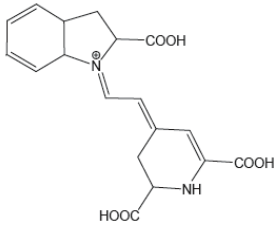
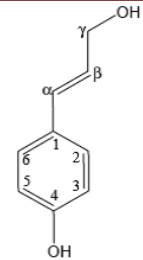
Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία φυτοχημικών που αριθμεί περίπου 8000 και παραπάνω μέλη τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου με έναν ή περισσότερους υδροξυ-υποκαταστάτες στο μόριό τους (Balasundram *et al.*, 2006; Manach *et al.*, 2004). Καλύπτουν ένα πολύ μεγάλο εύρος χημικών ενώσεων και η ταξινόμησή τους εμφανίζεται στην βιβλιογραφία με διάφορους τρόπους (Harborne & Simmonds, 1964; Ribéreau-Gayon, 1972; Robbins, 2003; Scalbert *et al.*, 2000; Swain & Bate-Smith, 1962; Urquiaga & Leighton, 2000). Συγκεκριμένα, οι Harborne και Simmonds (1964) ταξινόμησαν σε ομάδες τις ενώσεις αυτές με βάση τον αριθμό των ανθράκων στο μόριό τους, όπως φαίνεται στον *πίνακα 1.2*. Οι απλές φαινόλες, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή συνιστούν την πλειοψηφία των φαινολών στα φυτά, με τα φλαβονοειδή να φτάνουν σε αριθμό τις 5000 φαινολικές ενώσεις (Bravo, 1998).

Τα απλούστερα μέλη αυτής της κατηγορίας ανήκουν στις τάξεις των απλών φαινολών (C<sub>6</sub>) και των φαινολικών οξέων. Τα τελευταία χαρακτηρίζονται από την παρουσία καρβοξυλικής ομάδας. Όταν η καρβοξυλομάδα είναι άμεσος υποκαταστάτης του δακτυλίου τα φαινολικά οξέα είναι υδροξυ-παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, ενώ όταν αποτελεί τελική χαρακτηριστική ομάδα υπάρχουσας πλευρικής ανθρακικής αλυσίδας είτε είναι υδροξυ-παράγωγα του φαινυλοξικού οξέος, C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>, είτε του κινναμωμικού οξέος, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (Rice-Evans *et al.*, 1996; Robbins, 2003). Στις τάξεις των φαινολικών οξέων περιλαμβάνονται και οι φαινόλες με αλδεϋδική ομάδα, που είναι είτε υδροξυ-παράγωγα της βενζαλδεϋδης,

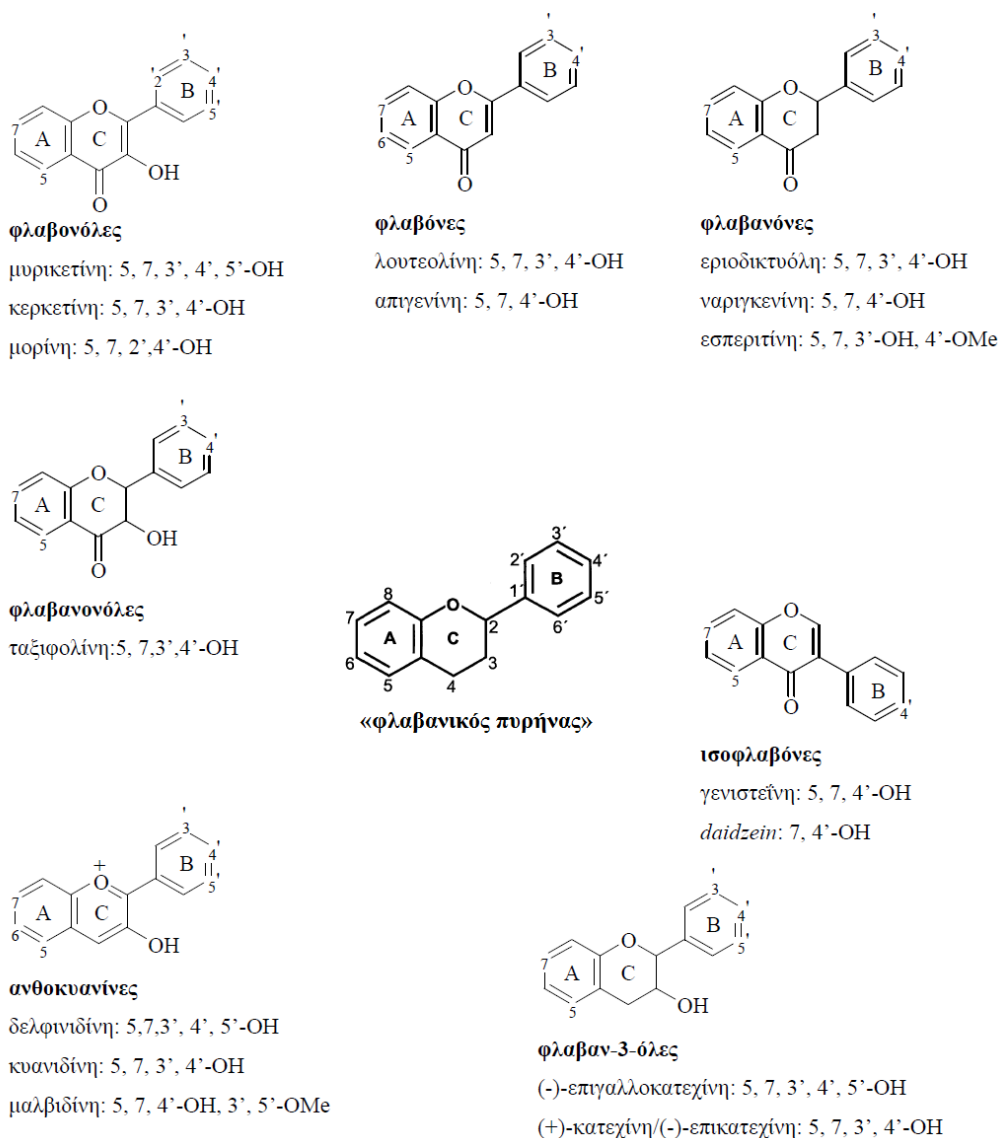
C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, είτε της κινναμωμικής αλδεΐδης, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, και πιο σπάνια συναντάται φαινόλη με κετονική ομάδα, τα υδροξυ-παράγωγα των ακετοφαινονών, C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>. (Robbins, 2003). Ακόμα, σκελετό C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> έχουν και οι κουμαρίνες, οι ισοκουμαρίνες και οι χρωμόνες οι οποίες περιλαμβάνουν ως μονάδα C<sub>3</sub> μία ετεροκυκλική ένωση με ετεροάτομο το οξυγόνο. Ανάλογα με τη δομή του ανθρακικού σκελετού διακρίνονται επίσης οι εξής πολυφαινόλες: οι βενζοφαινόλες και ξανθόνες με C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> σκελετό, τα στυλβένια (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), τα φλαβονοειδή (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) και διφλαβόνες (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, οι κινόνες (C<sub>6</sub> ή C<sub>10</sub> ή C<sub>14</sub>), οι βητακυανίνες (C<sub>18</sub>), οι λιγνάνες (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>2</sub> και λιγνίνες (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub>, οι ταννίνες και τα φλοβαφένια (Bravo, 1998, Vermerris & Nicholson, 2008).

Πίνακας 1.2: Ταξινόμηση φαινολικών ενώσεων με βάση τον αριθμό των ανθράκων

Κατηγορία	Συντακτικός τύπος	Βασική δομή
Απλές φαινόλες	C <sub>6</sub>	
Φαινολικά οξέα/αλδεΐδες/κετόνες	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> ή -C <sub>2</sub> ή -C <sub>3</sub>	
βενζοϊκά οξέα	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	
φαινολοξικά οξέα	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
κινναμωμικά οξέα	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
βενζαλδεΐδη	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	
κινναμωμική αλδεΐδη	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
ακετοφαινόνη	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Κουμαρίνες/ισοκουμαρίνες/χρωμόνες	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	

Βενζοφαινόνες/ξανθόνες	$C_6-C_3-C_6$	
Στιλβένια	$C_6-C_2-C_6$	
Φλαβονοειδή	$C_6-C_3-C_6$	
Διφλαβόνες	$(C_6-C_3-C_6)_2$	Διμερή φλαβονών
Κινόνες	$C_6$ ή $C_{10}$ ή $C_{14}$	
βενζοκινόνη	$C_6$	
ναφθοκινόνη	$C_6-C_4$	
ανθρακινόνη	$C_6-C_2-C_6$	
Βητακουανίνες	$C_{18}$	
Λιγνάνες	$(C_6-C_3)_2$	
Λιγνίνες	$(C_6-C_3)_n$	
Ταννίνες	Ολιγομερή ή πολυμερή	
Φλοβαφένια	Πολυμερή	

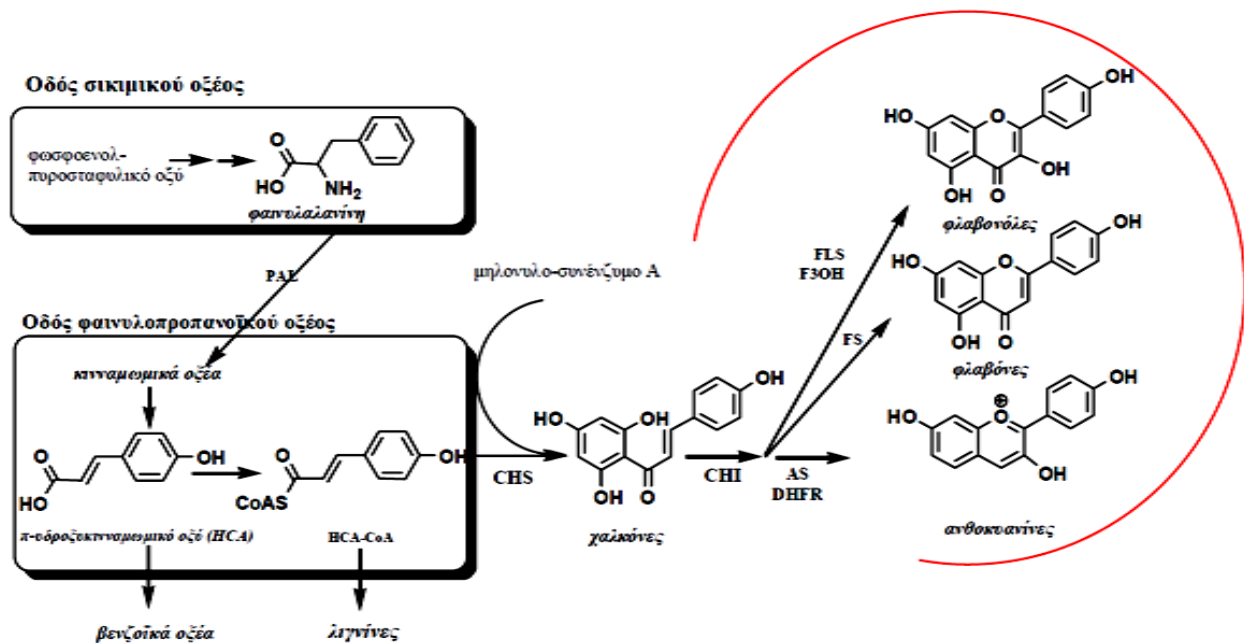
Η μεγαλύτερη τάξη, τα флаβονοειδή, περιλαμβάνει και τις πιο διαδεδομένες ενώσεις στη φύση που ομαδοποιούνται ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου σε флаβόνες, флаβονόλες, флаβανόνες, флаβανόλες, ισοφλαβόνες, флаβανονόλες και ανθοκυανιδίνες (Dey & Harborne, 1989). Οι πολυφαινόλες αυτές διαφέρουν ως προς την ύπαρξη υδροξυλομάδων ή και μεθόξυ ομάδων στα διάφορα σημεία του «φλαβανικού πυρήνα», όπως φαίνεται στην εικόνα 1.4 (Ορδούδη, 2007). Στην κατηγορία των флаβονοειδών ανήκουν ακόμα και οι χαλκόνες, οι διυδροχαλκόνες και οι αυρόνες με τη διαφορά από τα υπόλοιπα флаβονοειδή ότι τα δύο πρώτα έχουν μία γραμμική C<sub>3</sub>-αλυσίδα ενώ οι αυρόνες προέρχονται από κυκλοποίηση των χαλκονών με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένας πενταμελής ετεροκυκλικός δακτύλιος (Vermerris & Nicholson, 2008).



Εικόνα 1.4: Δομές φλαβονοειδών (Ορδούδη, 2007)

### 1.3.3. Βιοσύνθεση φαινολικών ενώσεων

Τα φυτά συνθέτουν μια πληθώρα ενώσεων με πολύπλοκη μοριακή δομή, τα προϊόντα του λεγόμενου δευτερογενούς μεταβολισμού, οι οποίες εμπλέκονται σε μια σειρά φυσιολογικών λειτουργιών. Η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών συνδέεται στενά με την ύπαρξη και τη λειτουργία θεμελιωδών αμυντικών μηχανισμών, αναγκαίων για την επιβίωση των φυτικών ειδών (Morris & Robbins, 1997). Οι φαινολικές ενώσεις προέρχονται κυρίως από τα μεταβολικά μονοπάτια του σικιμικού οξέος και των φαινυλοπροπανοειδών (Ribereau-Gayon *et al.*, 2007). Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φαινυλοπροπανοειδών είναι γενικά αποδεκτό ότι καταλήγει στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών. Ωστόσο, παρακλάδια της συγκεκριμένης μεταβολικής οδού έχουν σαν αποτέλεσμα τη βιοσύνθεση μιας πληθώρας φαινολικών ενώσεων (Harborne & Simmonds, 1964). Ενδεικτικά στάδια της βιοσυνθετικής οδού των φαινολικών ενώσεων παρουσιάζονται στην εικόνα 1.5.



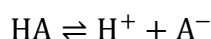
Εικόνα 1.5: Ενδεικτικά στάδια της βιοσυνθετικής οδού των φαινολικών ενώσεων (Sakihama *et al.*, 2002)

Η βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνει αρχικά σχηματισμό του *trans*-κινναμωμικού οξέος από το αρωματικό αμινοξύ L-φαινυλαλανίνη μέσω της οδού του σικιμικού οξέος. Από το *trans*-κινναμωμικό οξύ προκύπτουν στη συνέχεια μέσω της μεταβολικής οδού των φαινυλοπροπανοειδών οι κουμαρίνες, τα διάφορα

υδροξυκιναμωμικά οξέα, οι πιο πολύπλοκες χαλκόνες και τα στιλβένια. Περαιτέρω βιομετατροπές των χαλκονών οδηγούν στη σύνθεση ανώτερων φλαβονοειδών, ενώ από μεθοξυλιωμένα παράγωγα των υδροξυκιναμωμικών οξέων προκύπτουν οι λιγνίνες και οι λιγνάνες. Με εξαίρεση το γαλλικό οξύ, τα υπόλοιπα υδροξυβενζοϊκά οξέα προκύπτουν με αποικοδόμηση της πλευρικής αλυσίδας των αντίστοιχων υδροξυκιναμωμικών οξέων. Αντίθετα, η βιοσύνθεση του γαλλικού θεωρείται ότι γίνεται με ενζυμική μετατροπή του 3-διυδροσικιμικού οξέος, ενδιάμεσου προϊόντος της σικιμικής οδού (Parr & Boldwell, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1997; Robbins, 2003; Sakihama *et al.*, 2002; Ορδούδη, 2007).

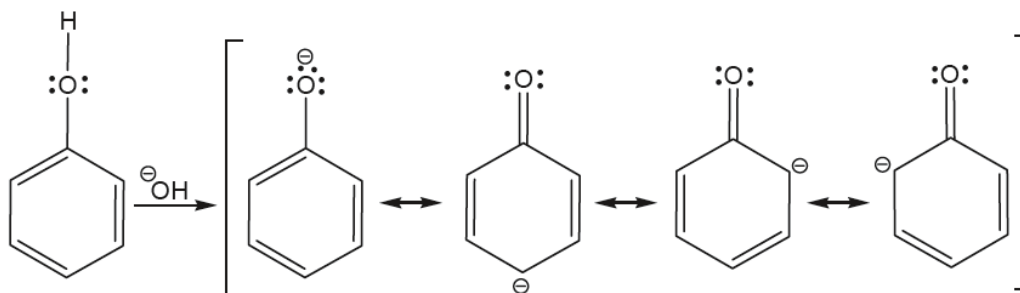
#### 1.3.4. Ο όξινος χαρακτήρας της φαινολικής υδροξυλομάδας

Δεδομένου ότι οι φαινολικές ενώσεις περιέχουν τουλάχιστον μία ομάδα υδροξυλίου το οποίο συνδέεται απευθείας σε έναν αρωματικό δακτύλιο η δραστηριότητα των φαινολικών ενώσεων σχετίζεται με τις χημικές ιδιότητες του δακτυλίου του βενζολίου. Η πρώτη ιδιότητα που εξετάζεται είναι η οξύτητα. Μια ένωση θεωρείται οξύ (HA), όταν μπορεί να απελευθερώσει ένα πρωτόνιο ( $H^+$ ) ενώ βρίσκεται σε ένα διάλυμα. Η σταθερά του οξέος,  $K_a$ , καθορίζει σε ποιο βαθμό το πρωτόνιο απελευθερώνεται. Τα ισχυρά οξέα δίστανται πλήρως, ενώ τα ασθενή οξέα είναι σε ισορροπία με τη διαστατή μορφή τους (*σχέση 1.1*) (Vermerris & Nicholson, 2008).



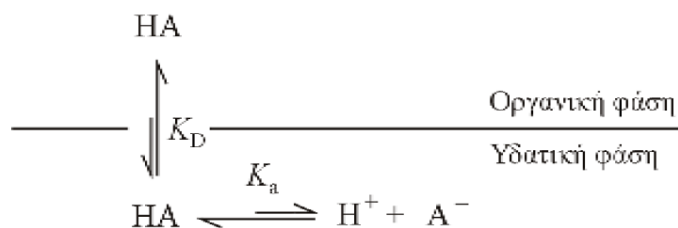
*Σχέση 1.1: Γενική αντίδραση διάστασης οξέος σε υδατικό διάλυμα Vermerris & Nicholson, 2008)*

Οι φαινολικές ενώσεις είναι, γενικά, ασθενή οξέα. Σε σύγκριση με τις υδροξυλομάδες των μη υποκατεστημένων αλειφατικών αλκοολών, η φαινολική υδροξυλομάδα είναι πιο όξινη. Αυτό ισχύει διότι το φαινολικό ανιόν που σχηματίζεται μετά την αφαίρεση του πρωτονίου από την ομάδα του υδροξυλίου είναι σχετικά σταθερό, λόγω της ύπαρξης αρκετών δομών συντονισμού, όπως φαίνεται στην *εικόνα 1.6*. Ως εκ τούτου, η φαινόλη είναι ένα ασθενές οξύ, με τιμή  $pK_a$  10 και βρίσκεται μεταξύ των καρβοξυλικών οξέων ( $pK_a = 4-5$ ) και των αλειφατικών αλκοολών ( $pK_a = 16-19$ ). Η πραγματική  $pK_a$  των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από την συνολική δομή του μορίου και τη φύση των υποκαταστατών στον αρωματικό δακτύλιο (Vermerris & Nicholson, 2008).



Εικόνα 1.6: Δομές συντονισμού της φαινόλης (Vermerris & Nicholson, 2008)

Η τιμή pKa είναι σημαντικό χαρακτηριστικό μιας φαινολικής ένωσης, δεδομένου ότι επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο ορισμένες φαινολικές ενώσεις διαχωρίζονται από ένα διάλυμα. Οι λιγότερο όξινο φαινόλες τείνουν να παραμένουν ως «ελεύθερες φαινόλες» και δεν θα είναι τόσο διαλυτές στο νερό. Αυτές οι ενώσεις μπορούν στη συνέχεια να εκχυλιστούν με οργανικούς διαλύτες (Vermerris & Nicholson, 2008). Στην περίπτωση εκχύλισης ενός ασθενούς οργανικού οξέος (HA) και υποθέτοντας ότι μόνο η αδιάστατη μορφή του (HA) είναι εκχυλίσιμη από το οργανικό διαλύτη (κάτι που ισχύει σχεδόν πάντοτε), τότε ο λόγος κατανομής του οξέος αναμένεται να εξαρτάται από το pH της υδατικής φάσης, αφού από το pH καθορίζεται η σχέση μεταξύ της εκχυλίσιμης μορφής (HA) και της μη εκχυλίσιμης μορφής (A<sup>-</sup>) του (Μπακέας & Ευσταθίου, 2008).



Εικόνα 1.7: Εκχύλιση μονοπρωτικού οξέος από υδατική φάση με οργανικό διαλύτη (Μπακέας & Ευσταθίου, 2008)

Στην εικόνα 1.7 παρουσιάζεται το υφιστάμενο σύστημα ισορροπιών: Η μία είναι η ισορροπία κατανομής της μορφής HA και η άλλη η ισορροπία διάστασης του HA προς H<sup>+</sup> και A<sup>-</sup>. Είναι προφανές ότι όσο πιο όξινη είναι η υδατική φάση, τόσο ευνοείται η εκχύλιση του HA από τον οργανικό διαλύτη και όσο πιο αλκαλική είναι η



υδατική φάση τόσο ευνοείται η παραμονή του ΗΑ στην υδατική φάση (Μπακέας & Ευσταθίου, 2008).

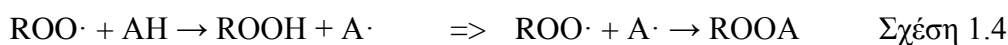
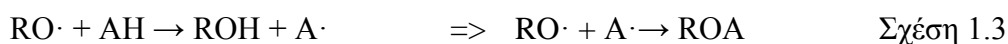
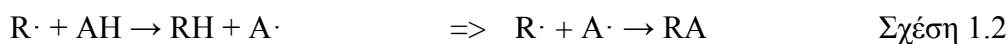
#### 1.3.5. Αντιοξειδωτική ικανότητα φαινολικών συστατικών

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που εμποδίζουν ή επιβραδύνουν την οξείδωση των συστατικών των τροφίμων επειδή έχουν την ικανότητα να απενεργοποιούν την περίσσεια των ελεύθερων ριζών με δύο βασικούς μηχανισμούς, (1) μεταφέροντας και προσφέροντας υδρογόνο και (2) προσφέροντας μονήρες ηλεκτρόνιο. Οι προαναφερθέντες μηχανισμοί λειτουργούν σχεδόν παράλληλα και με κυριαρχία του ενός ή του άλλου μηχανισμού. Οι φαινολικές ενώσεις, αφού ανήκουν στην κατηγορία των φυσικών αντιοξειδωτικών, δρουν μέσω του μηχανισμού των ελεύθερων ριζών (Prior *et al.*, 2005).

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε είδος ατόμου ή χημικής ένωσης που έχει την ικανότητα ανεξάρτητης, «ελεύθερης», ύπαρξης και μπορεί να περιέχει ένα ή και περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς και ιδιαίτερα δραστικές ενώσεις, προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια και έτσι τα μετατρέπουν με τη σειρά τους σε ελεύθερες ρίζες, αρχίζοντας έτσι μια αλυσιδωτή αντίδραση (Roberfroid & Calderon, 1990). Η καταστροφή των κυττάρων που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες φαίνεται ότι επηρεάζει έντονα το γήρας και τις εκφυλιστικές ασθένειες του γήρατος όπως είναι ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καταρράκτης, η καταπόνηση του ανοσοποιητικού συστήματος και η εγκεφαλική δυσλειτουργία. Γενικά, οι ρίζες αυτές έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεση τουλάχιστον πενήντα ασθενειών (Halliwell *et al.*, 1994; Lengseth *et al.*, 1993).

Οι φαινολικές ενώσεις αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και σχηματίζουν ενώσεις που δεν έχουν την τάση να δίνουν νέες ελεύθερες ρίζες. Η δράση τους αυξάνεται όταν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό. Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα είναι οι κύριοι τύποι των φαινολικών συστατικών και για αυτό έχει μελετηθεί εκτεταμένα η σχέση της δομής τους και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας που διαθέτουν σε υδατικά ή λιπόφιλα συστήματα (Burda & Oleszek 2001; Cao *et al.*, 1996; Natella *et al.*, 1999; Nenadis *et al.*, 2004; Rice-Evans *et al.*, 1996).

Συνοπτικά ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν οι φαινολικές ενώσεις δίνεται με τις παρακάτω αντιδράσεις (σχέσεις 1.2-1.4) (Roberfroid & Calderon, 1990):



*Σχέσεις 1.2-1.4: Αντιδράσεις ελευθέρων ριζών με φαινολικές ενώσεις, οι οποίες τερματίζονται όταν ενωθούν δύο ελεύθερες ρίζες (Roberfroid & Calderon, 1990)*

Τα φαινολικά οξέα λειτουργούν ως ουσίες που τερματίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών. Επιπλέον, τα ενδιάμεσα της φαινόξυ-ρίζας είναι σχετικά σταθερά και συνεπώς δεν μπορεί εύκολα να ξεκινήσει μια νέα αλυσιδωτή αντίδραση. Τα ενδιάμεσα της φαινόξυ-ρίζας δρουν επίσης ως ουσίες που τερματίζουν τον πολλαπλασιασμό των ριζών αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες.

Οι κύριες δομικές διαφορές μεταξύ αυτών των ενώσεων αφορούν στον αριθμό και τη θέση των υδροξυ- ή/και μεθοξυ- υποκαταστατών καθώς και στα χαρακτηριστικά της πλευρικής αλυσίδας. Επιπλέον υδροξυ- ομάδες επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των AH ανάλογα με τη σχετική θέση τους ως προς τους υπόλοιπους υποκαταστάτες. Για παράδειγμα, η παρουσία τρίτης υδροξυ- ομάδας σε ορθο- θέση θεωρείται ως το αποτελεσματικότερο δομικό χαρακτηριστικό φαινολών και υδροξυβενζοϊκών οξέων. Περισσότεροι από τρεις υδροξυ- υποκαταστάτες δεν ενισχύουν τη δραστηριότητα των ενώσεων (Shahidi & Wanasundara, 1992). Η παρουσία μεθοξυ- ομάδας σε ορθο- θέση ως προς το φαινολικό υδροξύλιο είναι ευνοϊκή για τη δραστηριότητα των μονοφαινολικών ενώσεων καθώς εισάγει στο δακτύλιο παρόμοια ηλεκτρονιακά φαινόμενα με εκείνα της υδροξυ- ομάδας. (Bors *et al.*, 2002).

Τα φλαβονοειδή είναι μεταξύ των πιο ισχυρών φυσικών αντιοξειδωτικών επειδή έχουν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω δομικά στοιχεία τα οποία εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική δράση (Ratty & Das, 1988):

- Δύο υδροξυλομάδες σε όρθο- θέση μεταξύ τους στο δακτύλιο B, οι οποίες προσφέρουν υψηλή σταθερότητα στο σχηματισμό ριζών και συμμετέχουν στον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων (Cao *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2002),
- Διπλό δεσμό C2-C3 και κετο-ομάδα C4 στον C δακτύλιο, τα οποία θεωρούνται σημαντικά χαρακτηριστικά όσον αφορά τη σταθεροποίηση της ρίζας του φλαβονοειδούς και είναι υπεύθυνα για τον απεντοπισμό ηλεκτρονίων από τον B δακτύλιο (Silva *et al.*, 2002; Vaya *et al.*, 2003) και

- Δύο υδροξυλομάδες στις θέσεις C3 στον C δακτύλιο και C5 στον A δακτύλιο οι οποίες δημιουργούν δεσμό υδρογόνου με την κετο-ομάδα C4 στον C δακτύλιο για μέγιστη δυνατότητα δέσμευσης των ριζών (Rice-Evans *et al.*, 1996).
- Θέσεις συμπλοκοποίησης ιόντων μετάλλων μεταξύ των υδροξυλομάδων στις θέσεις C3' και C4' στο δακτύλιο B, μεταξύ της υδροξυλομάδας C5 στον A δακτύλιο και της κετο-ομάδας C4 στον C δακτύλιο και μεταξύ της υδροξυλομάδας C3 και της κετο-ομάδας C4 στον C δακτύλιο (Cao *et al.*, 1996; Vaya *et al.*, 2003).

### 1.3.6. Σημασία των φαινολικών ενώσεων και εφαρμογές αυτών

Από τη δεκαετία του 1980 ερευνητές και βιομηχανίες τροφίμων επιδεικνύουν αυξημένο ενδιαφέρον για τις φαινολικές ενώσεις. Υπάρχουν πολλά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν θετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Έχει αναφερθεί ότι πολλά φαινολικά συστατικά έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα, με αποτέλεσμα να έχουν αντικαρκινικές, αντιμεταλλαξογόνες, αντιμικροβιακές, αντικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες σε μικρότερο ή σε μεγαλύτερο βαθμό. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής, ως συντηρητικά στα τρόφιμα και τα καλλυντικά και σε φαρμακευτικά σκευάσματα, (Cassidy *et al.*, 2000; Tapiero *et al.*, 2002; Vermerris & Nicholson, 2008). Τα αντιοξειδωτικά έχουν επίσης πολλές βιομηχανικές εφαρμογές όπως για παράδειγμα στην πρόληψη της αποικοδόμησης του καουτσούκ και βενζίνης (Dabelstein *et al.*, 2007) και ακόμα τα φαινολικά που προέρχονται από την αποσύνθεση της λιγνίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή προσθετικών ουσιών, σύνθεση πολυμερών ή ως προστατευτικά σε ξύλινες επιφάνειες (Cruz *et al.*, 2005).

Οι φαινολικές ενώσεις προστατεύουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες, το οποίο εκτιμάται ότι ευθύνεται για την ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος ασθενειών, όπως για παράδειγμα τη νόσο του Αλτσχάιμερ, τη νόσο του Πάρκινσον, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα κ.ά. Σύμφωνα με τις σύγχρονες τάσεις στη διατροφή, η αυξημένη κατανάλωση των αντιοξειδωτικών συμβάλλει στην καλή υγεία, στην ευεξία και στην καθυστέρηση των φαινομένων του γήρατος (Finkel & Holbrook, 2000). Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα, που βρίσκονται για παράδειγμα στο κόκκινο κρασί, στον καφέ, στο τσάι, στο κακάο, στο ελαιόλαδο, είναι οι κύριοι τύποι των φαινολικών συστατικών και για το λόγο αυτό έχει μελετηθεί εκτεταμένα η σχέση της δομής τους και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας που διαθέτουν σε υδατικά ή λιπόφιλα συστήματα. Λιγότερο δημοφιλείς αλλά το ίδιο σημαντικές είναι οι ανθοκυανίνες, οι οποίες βρίσκονται για παράδειγμα στα σταφύλια, στα μούρα και στα κρεμμύδια, και τα

στιλβένια, όπως η ρεσβερατρόλη, η οποία συναντάται στα σταφύλια, στα μούρα, στο κρασί, στο κάρυ κι αλλού (Burda & Oleszek, 2001; Cao *et al.*, 1996; Natella *et al.*, 1999; Nenadis *et al.*, 2004; Rice-Evans *et al.*, 1996). Οι περισσότερες ευεργετικές ιδιότητες των φλαβονοειδών αποδίδονται στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Επομένως, μπορούν να προστατεύουν τα κυτταρικά συστατικά από την οξείδωση, να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και να συμμετέχουν στην αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών, όπως είναι οι βιταμίνες C, E και β-καροτένιο. Με δεδομένη την ικανότητα τους να αναστέλλουν την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL), στα φλαβονοειδή έχουν αποδοθεί καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (Bravo, 1998).

## 1.4. Μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος

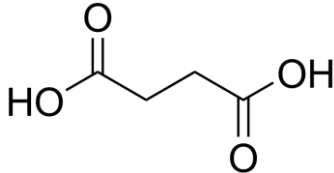
### 1.4.1. Το ηλεκτρικό οξύ και εφαρμογές του

Το ηλεκτρικό οξύ είναι ένα 1,4-δικαρβοξυλικό οξύ, το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως σημαντική χημική ουσία τα τελευταία χρόνια, αφού έχει αναγνωριστεί ως μία από τις κορυφαίες 12 υψηλής προστιθέμενης αξίας χημικές ουσίες που παράγονται από βιομάζα σε μια έκθεση που δημοσιεύθηκε από το Υπουργείο Ενέργειας των ΗΠΑ (Werpy & Petersen, 2004). Εντοπίστηκε για πρώτη φορά στο κεχριμπάρι (εικόνα 1.8), το οποίο είναι γνωστό ως succinum (=ήλεκτρο) στα λατινικά (Koutinas *et al.*, 2014). Η ελληνογενής ονομασία του αντικαθίσταται σταδιακά από τη λατινογενή σουκ(ξ)ινικό οξύ (Ευσταθίου, 2014). Οι ιδιότητες του ηλεκτρικού οξέος παρατίθενται στον πίνακα 1.3 (Perry *et al.*, 1997).

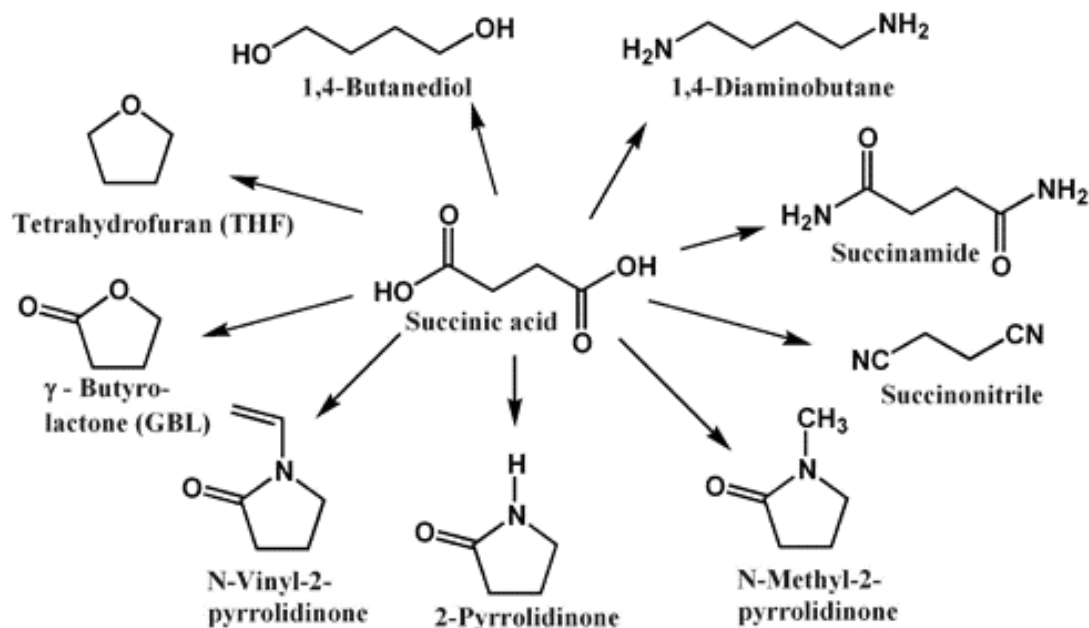


Εικόνα 1.8: Το κεχριμπάρι (αρχ. ελλ. ήλεκτρον) (Ευσταθίου, 2014)

Πίνακας 1.3: Χαρακτηριστικά και ιδιότητες του ηλεκτρικού οξέος (Perry et al., 1997)

Όνομα	Ηλεκτρικό Οξύ
Όνομασία κατά IUPAC	Βουτανοδιοϊκό οξύ
Χημικός τύπος	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
Συντακτικός τύπος	
Μοριακό βάρος	118,09 g·mol <sup>-1</sup>
Αριθμός CAS	110-15-6
Εμφάνιση	Άχρωμοι κρύσταλλοι σε Κ.Σ.
Σημείο τήξης	187-189°C (460-462 K)
Σημείο βρασμού	235°C (508,15 K)
Ειδικό βάρος	1,56
Διαλυτότητα στο νερό	100 g/100 mL (100 °C) 7,69 g/100 mL (25 °C)
pK <sub>a1</sub>	4,21
pK <sub>a2</sub>	5,64

Το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή διαφόρων χημικών ουσιών, ρητινών και βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, καθώς και επιφανειοδραστικών ουσιών, αφριστικών παραγόντων και απορρυπαντικών. Επιπλέον χρησιμοποιείται για να παραχθούν καλλυντικά, φαρμακευτικά είδη, αντιβιοτικά, αμινοξέα και βιταμίνες, μέχρι και πρόσθετα τροφίμων, όπου χρησιμοποιείται ως ρυθμιστής οξύτητας, ως βελτιωτής γεύσης και για την αντιμικροβιακή του δράση (Lee et al., 2002; Lin et al., 2008). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό σε ζωοτροφές αλλά και να ενισχύσει την ανάπτυξη των φυτών (Wan et al., 2008). Μία ακόμα σημαντική ένωση για την οποία το ηλεκτρικό οξύ είναι ενδιάμεσο είναι η 1,4-βουτανοδιόλη, μια χημική ουσία που αναμενόταν να έχει ζήτηση 479000 τόνους ετησίως μέχρι το 2008 και 1,5 εκατομμύρια τόνους μέχρι 2011 (McKinlay et al., 2007-b). Εκτός από το ηλεκτρικό οξύ, τα ηλεκτρικά άλατα καταναλώνονταν με ρυθμό 92000 τόνων ανά έτος από το 2003, γεγονός που δείχνει την αξιοσημείωτη ζήτηση για το ηλεκτρικό οξύ και τα παράγωγά του (McKinlay et al., 2007-b). Παραδείγματα των χημικών παραγώγων του ηλεκτρικού οξέος φαίνονται στην εικόνα 1.9 (Gallezot, 2012).



Εικόνα 1.9: Παράγωγες χημικές ουσίες με βάση το ηλεκτρικό οξύ (Gallezot, 2012)

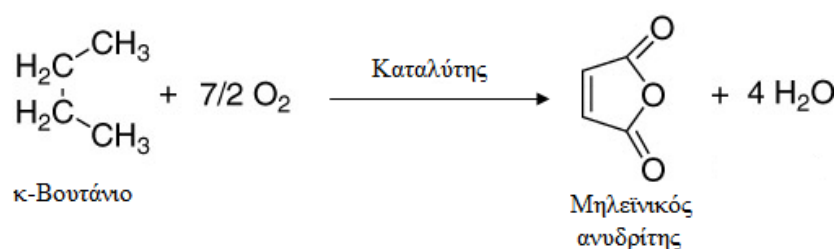
Το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να παραχθεί μέσω αναερόβιας ζύμωσης από βακτήρια που έχουν απομονωθεί από μηρυκαστικά ζώα και είναι ένα ενδιάμεσο του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (Lee *et al.*, 2002). Μέσω βιοδιεργασιών, το ηλεκτρικό οξύ παράγεται στην «ελεύθερη» μορφή του, δεδομένου ότι το pH της ζύμωσης είναι μεταξύ των τιμών pKa του, 4,2 και 5,6 (Lee *et al.*, 2008). Όταν το ηλεκτρικό οξύ συντίθεται από πετροχημικές πρώτες ύλες, χαρακτηρίζεται ως χημικό παράγωγο, ενώ όταν συντίθεται μέσω μικροβιακών ζυμώσεων θεωρείται ότι παράγεται φυσικά αφού προέρχεται από βιομάζα (Zeikus *et al.*, 1999). Αυτή η διάκριση των χημικών έναντι των βιολογικών διεργασιών μπορεί να αλλάξει τις εφαρμογές στις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί, καθώς και να επηρεάσει την τιμή πώλησής του.

Οι βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων έχουν εκφράσει την προτίμησή τους για χρήση του ηλεκτρικού οξέος που παράγεται από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, ακόμη και αν το προϊόν είναι πανομοιότυπο και με τις δύο μεθόδους παραγωγής (Gascon *et al.*, 2006). Από τις αρχές του 2008, η τιμή πώλησης του ηλεκτρικού οξέος κυμάνθηκε μεταξύ \$ 6 και \$ 9 ανά kg με ετήσια ζήτηση των 15 000 τόνων, με αύξηση από 6 έως 10% ετησίως (Bechthold *et al.*, 2008). Καθώς η ζύμωση τείνει να χαρακτηριστεί πιο συμφέρουσα μέθοδος οικονομικά και ο αριθμός των χημικών ουσιών που παράγονται από το ηλεκτρικό οξύ αυξάνει, θα αυξηθεί και η ζήτηση. Η τρέχουσα παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω των πετροχημικών διεργασιών έχει κόστος εισροών πρώτων υλών από \$ 1,03 ανά kg, ενώ η ζύμωση έχει υψηλότερο κόστος, αν και η εκτίμηση του κόστους βιοπαραγωγής ποικίλει ανάλογα με το

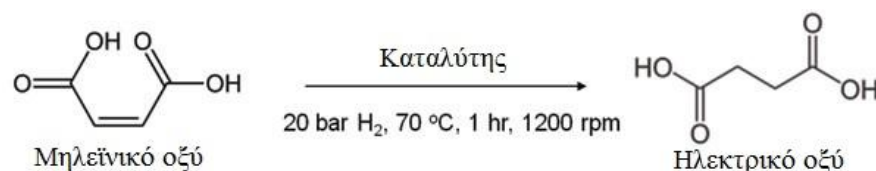
μέγεθος της παραγωγής (Song & Lee, 2006). Επί του παρόντος η μεγαλύτερη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέως σε βιομηχανική κλίμακα γίνεται μέσω χημικών διεργασιών (Zeikus *et al.*, 1999).

#### 1.4.2. Τρέχουσα παραγωγή ηλεκτρικού οξέως

Το ηλεκτρικό οξύ με τη χρήση πετροχημικών πόρων παράγεται μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης του μηλεϊνικού ανυδρίτη, ο οποίος με τη σειρά του παράγεται από το κ-βουτάνιο μέσω ετερογενούς καταλυτικής οξειδωσης. Η αντίδραση από μηλεϊνικό ανυδρίτη σε ηλεκτρικό οξύ αρχίζει με υδρόλυση, όπου διασπάται ένας από τους απλούς δεσμούς μεταξύ του άνθρακα και του οξυγόνου, σχηματίζοντας μηλεϊνικό οξύ. Η προσθήκη του υδρογόνου διασπά το διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα και ολοκληρώνει την αντίδραση, σχηματίζοντας ηλεκτρικό οξύ (Gascon *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008-b). Οι απλοποιημένες μορφές των αντιδράσεων του κ-βουτανίου σε μηλεϊνικό ανυδρίτη και του μηλεϊνικού οξέως σε ηλεκτρικό οξύ δείχνονται παρακάτω στις εικόνες 1.10 και 1.11 (Chiusoli & Maitlis, 2006).



Εικόνα 1.10: Αντίδραση του κ-βουτανίου σε μηλεϊνικό ανυδρίτη (Chiusoli & Maitlis, 2006)



Εικόνα 1.11: Αντίδραση του μηλεϊνικού οξέως σε ηλεκτρικό οξύ (Chiusoli & Maitlis, 2006)

Το ηλεκτρικό οξύ που παράγεται από ενώσεις πετρελαίου διαφέρει από το γεγονός ότι δεν είναι ένα φυσικό προϊόν (Song & Lee, 2006). Ενώ αυτή η μέθοδος παραγωγής είναι σήμερα φθηνότερη από την επεξεργασία με ζύμωση, υπάρχουν

μερικά πολύ μεγάλα μειονεκτήματα (Wan *et al.*, 2008). Όπως υποδηλώνει και ο όρος, πετροχημικές διεργασίες, το ηλεκτρικό οξύ παράγεται με τη χρήση μη ανανεώσιμων πόρων, όπως για παράδειγμα το φυσικό αέριο, το οποίο είναι δύσκολο να ανανεωθεί με το πέρασμα των χρόνων. Καθώς αυτή η πρώτη ύλη θα είναι πιο δύσκολο να βρεθεί και η ζήτησή της θα συνεχίζει να αυξάνεται, θα γίνεται όλο και πιο ακριβή (Isar *et al.*, 2006). Επιπλέον, η εξαγωγή του πετρελαίου και του φυσικού αερίου από τα αποθέματα, η μεταφορά και η επεξεργασία αυτών απαιτούν πολλή ενέργεια και εκλύεται στην ατμόσφαιρα μεγάλο ποσό εκπομπών (McKinlay *et al.*, 2007-b). Η διαδικασία αυτή δε χαρακτηρίζεται βιώσιμη και απαιτείται μια εναλλακτική λύση αν οι βιομηχανίες θέλουν να συνεχίσουν να παράγουν ηλεκτρικό οξύ αφού αυξάνεται η ζήτησή του (Wan *et al.*, 2008).

#### 1.4.3. Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω ζύμωσης

Η διαδικασία της ζύμωσης αυξάνει το ενδιαφέρον καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθούν ανανεώσιμες πρώτες ύλες ως υποστρώματα και θεωρείται ως μία πιο «πράσινη» τεχνολογία, σε σύγκριση με τη χημική παραγωγή, λόγω της κατανάλωσης ανανεώσιμων πόρων και της περιορισμένης επίπτωσης στο περιβάλλον (McKinlay *et al.*, 2007-b). Η κατεύθυνση προς την οποία οδεύει η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μπορεί να συνοψιστεί σε ένα απόσπασμα από τους McKinlay *et al.* (2007-b): «Λαμβάνοντας υπόψη το τρέχον πολιτικό και οικονομικό κλίμα που βασίζεται στις βιομηχανίες πετρελαίου, τα χημικά προϊόντα που προέρχονται από βιοδιεργασίες είναι σε θέση να συμπληρώνουν και να ανταγωνίζονται τις υπάρχουσες αγορές πετροχημικών προϊόντων» (Herburn, 2011).

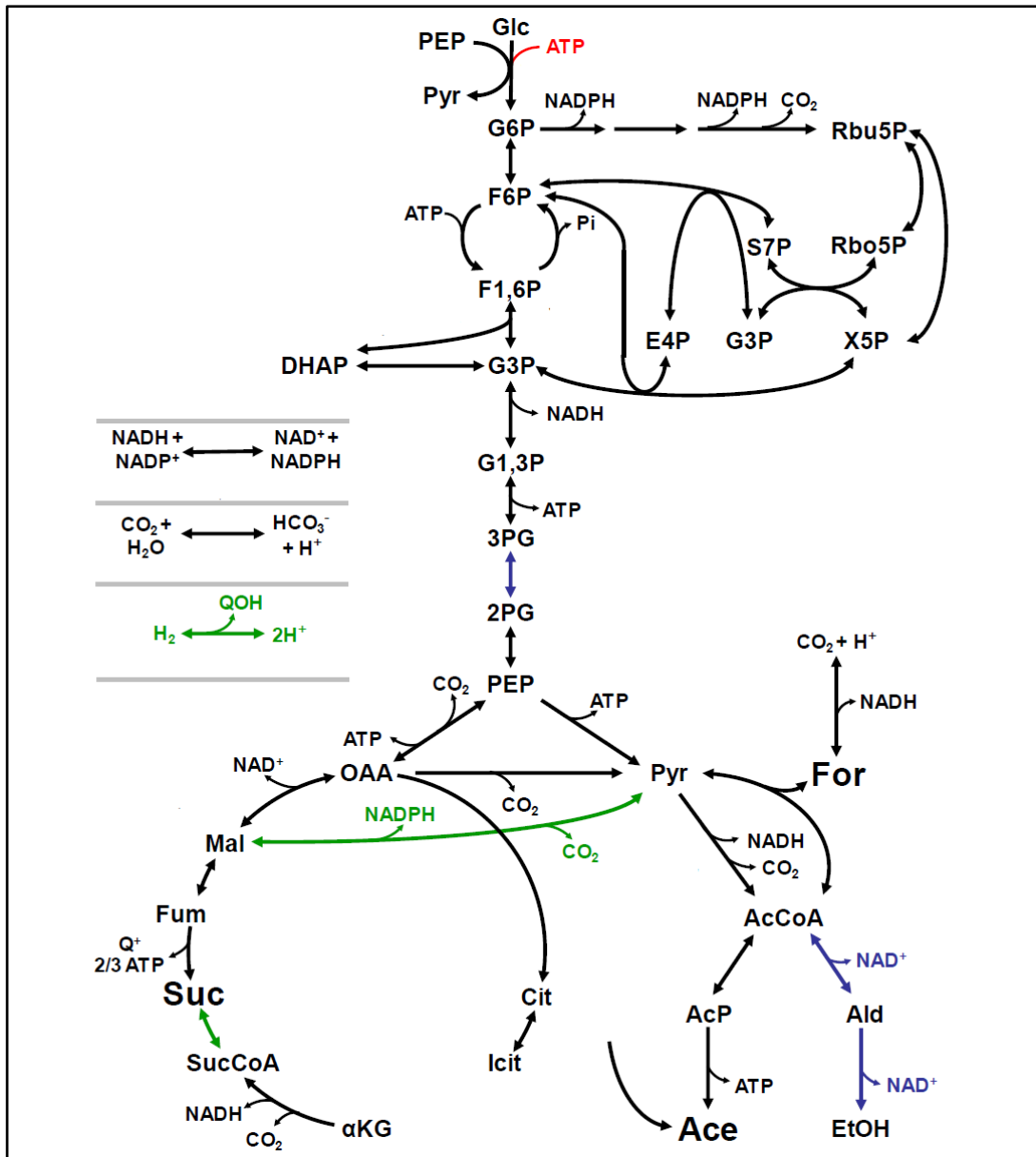
Στις Ηνωμένες Πολιτείες, μόνο, εκτιμάται ότι πάνω από 1 δισεκατομμύριο τόνοι βιομάζας ανά έτος είναι διαθέσιμοι από τους τομείς της δασοκομίας και της γεωργίας, χωρίς να επηρεάζονται οι προμήθειες τροφίμων, για να αντικαταστήσει το 30% της σημερινής κατανάλωσης πετρελαίου των ΗΠΑ ως καύσιμο αλλά και για την παραγωγή χημικών ενώσεων και ενέργειας (Perlack *et al.*, 2005). Επίσης, σε μελέτη του 2007 σχετικά με τη βιοπαραγωγή του ηλεκτρικού οξέος από βιομηχανίες, προβλέπεται ότι για όλες τις χημικές ουσίες που μπορούν να παραχθούν από ηλεκτρικό οξύ ως ενδιάμεσο, υπάρχει μια αγορά \$ 15 δισεκατομμυρίων (McKinlay *et al.*, 2007-b). Οι εκτιμήσεις προκύπτουν από το γεγονός ότι το ηλεκτρικό οξύ που μπορεί να παραχθεί μέσω ζύμωσης κοστίζει \$ 2,20 ανά kg σε επίπεδο παραγωγής 5000 τόνων ετησίως, αλλά η τιμή θα έπεφτε στα \$ 0,55 ανά kg εάν τα επίπεδα παραγωγής έφταναν τους 75000 τόνους ετησίως (Kang και Chang, 2005).

Για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω αναερόβιας ζύμωσης (εικόνα 1.12), η γλυκόζη μετατρέπεται σε ηλεκτρικό οξύ μέσω του αναγωγικού τμήματος του κύκλου



των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA), αφού υπό αναερόβιες συνθήκες το ηλεκτρικό οξύ αποτελεί δέκτη πρωτονίων αντί για το οξυγόνο (Cheng *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2002). Πρώτα, η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφορική-γλυκόζη καταλυόμενη από το ένζυμο εξοκινάση, ένζυμο της γλυκολυτικής οδού Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). Στη συνέχεια, ένζυμα που αποτελούν επίσης μέρος της EMP γλυκολυτικής οδού οδηγούν την πορεία προς την παραγωγή του φωσφο-ενολοπυροσταφυλικού (PEP) (McKinlay & Vieille, 2008). Από το PEP, η μεταβολική οδός μπορεί να λάβει μία από τις δύο εικονιζόμενες διαδρομές ανάλογα με τα επίπεδα του διοξειδίου του άνθρακα που υπάρχουν στη διάθεση του συστήματος της ζύμωσης (McKinlay *et al.*, 2007-a). Αν δεν υπάρχει αρκετή ποσότητα CO<sub>2</sub> στο σύστημα (10 mole CO<sub>2</sub> ανά 100 mole γλυκόζης), η προτιμώμενη μεταβολική οδός δημιουργεί τα τελικά προϊόντα μυρμηκικό οξύ, αιθανόλη και οξικό οξύ. Με άφθονη παροχή του διοξειδίου του άνθρακα στο σύστημα (100 mole CO<sub>2</sub> ανά 100 mole γλυκόζης), ευνοείται η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από τον μικροοργανισμό (McKinlay & Vieille, 2008).

Μέσω της διαδρομής που ευνοείται η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος, το PEP μετατρέπεται σε οξαλοξικό από την PEP καρβοξυκινάση με την προσθήκη CO<sub>2</sub>. Αυτή η μετατροπή με τη σειρά της δημιουργεί μια αλυσίδα αντιδράσεων τεσσάρων ατόμων άνθρακα, δίνοντας σε αυτή τη σειρά των αντιδράσεων την ονομασία «C<sub>4</sub> μονοπάτι» (Lee *et al.*, 2008). Η παρουσία υψηλής ποσότητας διοξειδίου του άνθρακα στο σύστημα ρυθμίζει έντονα τη δραστηριότητα της PEP καρβοξυκινάσης (Zeikus *et al.*, 1999). Στην επόμενη αναγωγική αντίδραση προστίθεται υδρογόνο στο οξαλοξικό για να παραχθεί μηλικό μέσω της μηλικής αφυδρογονάσης, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε φουμαρικό μέσω της φουμαράσης με την απομάκρυνση ενός μορίου ύδατος (McKinlay & Vieille, 2008). Τέλος, με την προσθήκη υδρογόνου από το ένζυμο φουμαρική αναγωγή, σχηματίζεται το ηλεκτρικό οξύ στην ιοντική μορφή του, η οποία είναι κοινή, αφού η τιμή pH βρίσκεται είναι πάνω από τις τιμές pK<sub>a</sub> του ηλεκτρικού οξέος (McKinlay & Vieille, 2008; Zeikus *et al.*, 1999). Το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να δημιουργηθεί από πρωτονίωση του ηλεκτρικού ανιόντος και να παραχθεί το αδιάστατο οξύ (Hepburn, 2011; McKinlay *et al.*, 2007-a).



Εικόνα 1.12: Βιοχημικό μονοπάτι μεταβολισμού της γλυκόζης του βακτηρίου *Actinobacillus succinogenes* (McKinley et al., 2010)

Ωστόσο, αυτή η μέθοδος παραγωγής δεν πραγματοποιείται χωρίς ανεπιθύμητα παραπροϊόντα. Στη μεταβολική οδό στην εικόνα 1.12, φαίνεται ότι η μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφορική-γλυκόζη λαμβάνει χώρα με την παράπλευρη αντίδραση μετατροπής του PEP σε πυροσταφυλικό, ένα μη αναστρέψιμο στάδιο, παράγοντας στη συνέχεια αιθανόλη, οξικό, και μυρμηκικό οξύ (McKinlay και Vieille, 2008). Έχει αποδειχθεί ότι σε υψηλά επίπεδα CO<sub>2</sub> η δράση του ενζύμου PEP καρβοξυκινάση αυξάνεται ενώ η αλκοολική και γαλακτική αφυδρογονάση που ευθύνονται για την παραγωγή αιθανόλης και γαλακτικού οξέος δεν είναι ανιχνεύσιμες. (Samuelon et al.

1991; Van der Werf *et al.* 1997). Όταν τα επίπεδα CO<sub>2</sub> είναι υψηλά η μέγιστη θεωρητική απόδοση της παραγωγής ηλεκτρικού με βάση το ισοζύγιο άνθρακα είναι 1,3 g·g<sup>-1</sup> γλυκόζης (2 mole·mole<sup>-1</sup> γλυκόζης), δεδομένου ότι η ροή του άνθρακα οδηγείται προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Zeikus *et al.*, 1999).

Ένα ακόμα σημαντικό εμπόδιο για την απόκτηση υψηλής απόδοσης ηλεκτρικού οξέος μέσω της αναερόβιας οδού είναι ο περιορισμός των NADH. Αυτό συμβαίνει επειδή για κάθε 1 mole γλυκόζης 2 mole NAD<sup>+</sup> ανάγονται προς 2 mole NADH διαμέσου της γλυκολυτικής οδού, ενώ για την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος χρειάζονται 4 mole NADH για να οξειδωθούν προς 2 mole NAD<sup>+</sup> μέσω του αναγωγικού τμήματος του κύκλου TCA (Cheng *et al.*, 2012). Ως εκ τούτου, η γραμμομοριακή απόδοση του ηλεκτρικού περιορίζεται σε 1 mole·mole<sup>-1</sup> γλυκόζης υποθέτοντας ότι όλη η ροή του άνθρακα έχει κατεύθυνση προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Για αυτό το λόγο, έχει προταθεί η προσθήκη αερίου υδρογόνου επιπλέον της παροχής διοξειδίου του άνθρακα, για να ενεργεί ως αναγωγικός παράγοντας, αφού το ηλεκτρικό οξύ είναι ένα εξαιρετικά ανηγμένο προϊόν και μπορεί να περιορίσει τον ρυθμό της αντίδρασης (Lee *et al.*, 1999; McKinlay & Vieille, 2008). Σε μελέτες που έχουν γίνει από τους Lee *et al.* (1999), η προσθήκη του υδρογόνου συχνά μειώνει τη διάρκεια της ζύμωσης, καθιστώντας τη διαδικασία πιο αποδοτική. Άλλες μελέτες, πάλι, δεν κάνουν καμία αναφορά στην προσθήκη αερίου υδρογόνου και περιλαμβάνουν συγκρίσιμες συγκεντρώσεις του ηλεκτρικού οξέος (Herburn, 2011; Lee *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2008-b).

Προκειμένου η μικροβιακή παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος να γίνει οικονομικότερη πρέπει να πραγματοποιηθούν σημαντικές βελτιώσεις της βιοδιεργασίας επιτυγχάνοντας υψηλή απόδοση και συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος με χρήση φτηνών πηγών άνθρακα (Glassner & Datta, 1989). Η ζύμωση απαιτεί τόσο το υπόστρωμα όσο και τα μέσα που περιέχουν τις πηγές ενέργειας, δηλαδή τα θρεπτικά συστατικά και μέταλλα που απαιτούνται για να εξασφαλισθούν τα βέλτιστα ποσοστά παραγωγικότητας (Lee *et al.*, 2002). Ανάλογα με τον μικροοργανισμό που επιλέγεται για τη διαδικασία της ζύμωσης, υπάρχουν πολλές διαθέσιμες πηγές άνθρακα. Στην περίπτωση της παραγωγής ηλεκτρικού οξέος, τα περισσότερα από τα κύρια σάκχαρα που περιέχονται στη βιομάζα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά, μεταξύ αυτών είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η γαλακτόζη, ημαννόζη, η αραβινόζη και η ξυλόζη, (Koutinas *et al.*, 2014; McKinlay *et al.*, 2007-a).

Το κόστος αυτών των σακχάρων είναι σχετικά χαμηλό αλλά έχουν εξετασθεί και άλλες πηγές άνθρακα, από γλυκερόλη και υδρολύματα ξύλου μέχρι και τυρόγαλα, στην προσπάθεια να μειωθεί περαιτέρω το κόστος της ζύμωσης (Bechthold *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2008). Οι McKinlay *et al.* (2007-b) δείχνουν ότι η αγορά που βασίζεται στο ηλεκτρικό οξύ που παράγεται μέσω ζύμωσης μπορεί να είναι

οικονομικότερη υπό την προϋπόθεση ότι η τιμή του πετρελαίου παραμένει πάνω από \$ 40 ανά βαρέλι και το καλαμπόκι παραμένει πάνω από \$ 90 ανά τόνο. Οι McKinlay *et al.* (2007-b) επίσης δείχνουν ότι οι στόχοι απόδοσης και παραγωγικότητας του ηλεκτρικού οξέος  $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , αντίστοιχα, είναι ιδανικοί στόχοι παραγωγής προκειμένου να ανταγωνιστούν οι βιοδιεργασίες τις χημικές μεθόδους της παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος.

#### 1.4.4. Βακτήρια για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος

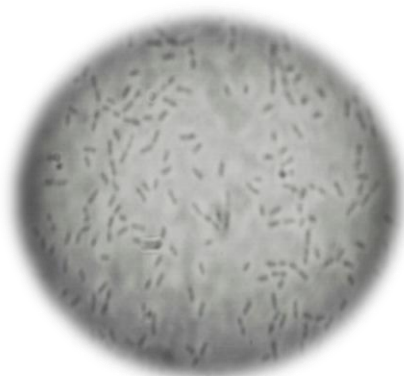
Με γνώμονα το υψηλό βιομηχανικό ενδιαφέρον, έχουν απομονωθεί διαφορετικοί μικροοργανισμοί τα τελευταία χρόνια που παράγουν μεγάλες ποσότητες ηλεκτρικού οξέος (Lee *et al.*, 2002; McKinlay *et al.*, 2007-b). Το ηλεκτρικό οξύ που παράγεται στη μεγάλη κοιλία από τα υπάρχοντα βακτήρια λειτουργεί ως μία σημαντική πρόδρομη ένωση για το σχηματισμό προπιονικού οξέος (Baldwin & Allison, 1983). Τα βακτήρια που παράγουν ηλεκτρικό οξύ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και που βρίσκονται στο επίκεντρο της πλειοψηφίας των ερευνών είναι τα: *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succinoproducens* και *Mannheimia succiniciproducens* (Borges & Pereira, 2011). Αυτά τα βακτηριακά στελέχη έχουν βρεθεί στη μεγάλη κοιλία μηρυκαστικών και ανήκουν στην οικογένεια Pasteurellaceae. Προσφάτως απομονώθηκε και το βακτήριο *Basfia succiniproducens*, ένα νέο μέλος της οικογένειας Pasteurellaceae (Becker *et al.*, 2013).

Άλλα βακτήρια που έχουν βρεθεί στη μεγάλη κοιλία μηρυκαστικών είναι το *Ruminococcus flavefaciens*, το *Bacteroides samylophilus*, το *Prevotella ruminicola*, το *Succinimonas amylolytica*, το *Succinivibrio dextrinisolvans*, το *Wolinella succinogenes* και το *Cytophaga succinicans* (Davis *et al.*, 1976; Guettler *et al.*, 1999; Van der Werf *et al.*, 1997). Τέλος, αρκετά στελέχη του γαστρεντερικού βακτηρίου *Escherichia coli* έχουν σχεδιασθεί γενετικά για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, αλλά αυτά δε βρίσκονται στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών. Οι συγκεντρώσεις του ηλεκτρικού οξέος που παράγεται από αυτά τα βακτήρια κυμαίνονται από  $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  για το μεταλλαγμένο βακτήριο *E. coli* έως  $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  για το *A. succinogenes* (Corona-Gonzalez *et al.*, 2008).

##### 1.4.4.1. *Actinobacillus succinogenes*

Ο κυριότερος παραγωγός ηλεκτρικού οξέος που συναντάται στο μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας είναι ο μικροοργανισμός *A. succinogenes*, ιδίως το στέλεχος 130Z, (American Type Culture Collection-ATCC 55618), (εικόνα 1.13). Το βακτήριο

αυτό απομονώθηκε από τη μεγάλη κοιλία βοοειδών στο Ινστιτούτο Βιοτεχνολογίας του Μίσιγκαν (Michigan Biotechnology Institute-MBI) από τους Guettler *et al.* (1999). Είναι προαιρετικά αναερόβιο, καπνόφιλο και gram-αρνητικό βακτήριο. Οι αποικίες του έχουν διάμετρο 0,8 μm, είναι ημιδιαφανείς και γκριζωπού χρώματος μετά από 24 ώρες στους 37 °C. Τα κύτταρα είναι κοκκοειδή και ραβδοειδούς σχήματος και συνήθως σχηματίζουν μικρού μήκους αλυσίδες. Ο μικροοργανισμός αυτός είναι θετικός στην καταλάση, οξειδάση και αλκαλική φωσφατάση (Guettler *et al.*, 1999). Το βακτήριο αυτό θεωρείται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε βιομηχανική κλίμακα (Wan *et al.*, 2008).



Εικόνα 1.13: Εικόνα από το μικροσκόπιο του στελέχους 130Z

Οι Guettler *et al.* (1999) έχουν αναφέρει ότι σε σύγκριση με άλλα βακτήρια που παράγουν ηλεκτρικό οξύ, το *A. succinogenes* παρήγαγε τις μεγαλύτερες ποσότητες (Samuelon *et al.*, 1991). Οι τυπικές συγκεντρώσεις παραγωγής που έχουν αναφερθεί είναι μεταξύ 30 έως 60 g·L<sup>-1</sup> μετά από 48 ώρες (Liu *et al.*, 2008-a; Liu *et al.*, 2008-b) με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να φτάνουν τα 80 g·L<sup>-1</sup> με απόδοση 0,87 g·g<sup>-1</sup> (Guettler *et al.* 1996-b). Πολλές πηγές ακόμα αναφέρουν ότι ο *A. succinogenes* είναι ο επιλεγόμενος μικροοργανισμός για τη δημιουργία μιας βιομηχανικής διαδικασίας, που έχει υψηλή ανοχή στο ηλεκτρικό οξύ (Lin *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2008).

Ένας άλλος παράγοντας που εξετάζεται είναι η παρεμπόδιση του προϊόντος στην ανάπτυξη των κυττάρων. Δεδομένου ότι το προϊόν συσσωρεύεται στο υγρό της ζύμωσης, η παραγωγή του μειώνεται καθώς ο μικροοργανισμός αναγκάζεται να καταναλώσει περισσότερη ενέργεια για να διατηρηθεί παρά για την ανάπτυξη των κυττάρων ή και για την παραγωγή του τελικού επιθυμητού προϊόντος. Οι μικροοργανισμοί που δείχνουν ανοχή σε μεγάλες συγκεντρώσεις προϊόντος μπορούν να συνεχίσουν να παράγουν γρήγορα και να δώσουν μια υψηλότερη τελική συγκέντρωση. Σίγουρα όμως υπάρχει ένα ανώτατο όριο για την επιθυμητή τελική

συγκέντρωση του προϊόντος (Herburn, 2011). Μια μελέτη από τους Wan *et al.* (2008) έδειξε ότι το βακτήριο *A. succinogenes* θα μπορούσε να αντέξει μια συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος έως  $66,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , πριν η παραγωγή σταματήσει μετά από 84 ώρες, που δείχνει ότι η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μπορεί να συνεχιστεί μέχρι και σε υψηλές συγκεντρώσεις πριν το κύτταρο παρεμποδιστεί από τη συγκέντρωση του τελικού προϊόντος.

Εκτός από την υψηλή ανοχή στα προϊόντα, ο *A. succinogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε μια ευρεία ποικιλία πηγών ανθράκων. Μια μελέτη από τους Zeikus *et al.* (1999) έδειξε ότι αυτός ο μικροοργανισμός μπορεί να καταναλώσει L-αραβινόζη, κελλοβιόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, λακτόζη, μαλτόζη, μαννιτόλη, μαννόζη, σακχαρόζη και D-ξυλόζη. Σε μία ακόμα μελέτη προστίθεται και η ξυλόζη, σάκχαρο το οποίο μπορεί να καταναλώσει ο μικροοργανισμός *A. succinogenes* και να παράξει ηλεκτρικό οξύ (Wan *et al.*, 2008). Όλα τα βακτήρια που μπορούν να ζυμώσουν τη γλυκόζη σε ηλεκτρικό οξύ απαιτούν αναερόβιες συνθήκες, αλλά πολλοί από αυτούς τους διαφορετικούς μικροοργανισμούς απαιτούν αυστηρές αναερόβιες συνθήκες. Στην περίπτωση του *A. succinogenes* μικρή ποσότητα του οξυγόνου μπορεί να είναι ανεκτή στο περιβάλλον της ζύμωσης (Urbance *et al.*, 2003). Αυτή η ανοχή αποτελεί μία ακόμα επιθυμητή ιδιότητα του βακτηριακού αυτού στελέχους ως προς την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος, καθώς απαιτείται μικρότερη προετοιμασία για την απομάκρυνση του οξυγόνου από το σύστημα (Herburn, 2011).

Η χρήση του *A. succinogenes* για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος αποδίδει πολύ λιγότερη ποσότητα παραπροϊόντων σε σύγκριση με άλλα βακτήρια, καθιστώντας τη διαδικασία διαχωρισμού απλούστερη και λιγότερο δαπανηρή. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τους Guettler *et al.* (1996-a), με αυτό το συγκεκριμένο στέλεχος έδειξαν ότι η αναλογία μάζας ηλεκτρικού οξέος προς οξικό οξύ ήταν 85 προς 1 και ηλεκτρικού οξέος προς μυρμηκικό οξύ 160 προς 1. Μία ακόμα μελέτη έδειξε ότι όταν το ηλεκτρικό οξύ παράχθηκε από μελάσα ζαχαροκάλαμου, επιτεύχθηκε συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος  $39,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ενώ η συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν μόνο  $4,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και του μυρμηκικού οξέος  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , δίνοντας αναλογίες 9 προς 1 και 26,3 προς 1, αντίστοιχα (Liu *et al.*, 2008-b). Αυτές οι αναλογίες θεωρούνται ακόμα αρκετά υψηλές και δείχνουν ότι ο *A. succinogenes* είναι μια ιδανική επιλογή για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Αν και υπάρχουν πολλά οφέλη χρησιμοποιώντας αυτόν τον μικροοργανισμό, εξακολουθούν να υπάρχουν περιορισμοί στη βιοπαραγωγή του ηλεκτρικού οξέος που πρέπει να αντιμετωπιστούν.

Στο βιοχημικό μονοπάτι του βακτηρίου *A. succinogenes*, το οποίο ήδη παρουσιάστηκε (εικόνα 1.12), φαίνεται πως η 6-φωσφορική γλυκόζη καταβολίζεται σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκόλυσης EMP αλλά και με μικρή συμμετοχή στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Σημαντικό είναι επίσης το

γεγονός ότι δεν παράγεται ως παραπροϊόν το γαλακτικό οξύ παρά μόνο αιθανόλη, μυρμηκικό και οξικό οξύ (McKinley *et al.*, 2010). Ακόμα, οι μελέτες των McKinley *et al.* (2010) έδειξαν πως το βακτήριο *A. succinogenes* δεν ακολουθεί την βιοχημική οδό Entner-Doudoroff και τον κύκλο του γλυοξυλικού οξέος. Τέλος, ενδιαφέρον είναι ότι η μεταβολική αυτή οδός για το *A. succinogenes* είναι αρκετά παρόμοια με εκείνη του *A. succinoproducens* αφού τα βήματα από την παραγωγή του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού μέχρι και τον σχηματισμό του ηλεκτρικού οξέος είναι ταυτόσημα (Van der Werf *et al.*, 1997).

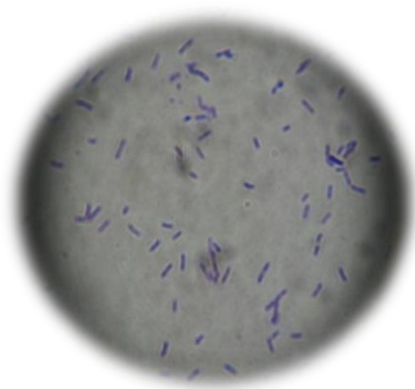
#### 1.4.4.2. *Basfia succiniciproducens*

Μεταξύ των βακτηρίων που έχουν απομονωθεί βρίσκεται και το βακτήριο *Basfia succiniciproducens*, ένα νέο μέλος της οικογένειας Pasteurellaceae, που παράγει σημαντικές ποσότητες ηλεκτρικού οξέος σε ένα περιβάλλον με αρκετά υψηλά τα επίπεδα CO<sub>2</sub>, όπως είναι η μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών ζώων. Αν και δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά ακόμα χαρακτηρίζεται ως δυνητικά άριστο μελλοντικό παραγωγό για τη βιομηχανική παραγωγή του οξέος αυτού (Scholten και Dägele, 2008).

Οι Scholten & Daegele (2008) μελέτησαν την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από γλυκερόλη με τη χρήση ενός βακτηριακού στελέχους DD1 από την οικογένεια Pasteurellaceae σε φιάλες των 100 ml ( $V_w = 50$  mL). Οι ερευνητές εξέτασαν και σύγκριναν και άλλες πηγές άνθρακα, εκτός από τη γλυκερόλη, ως υποστρώματα όπως σακχαρόζη, γλυκόζη, ξυλόζη και φρουκτόζη. Οι ζυμώσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις αρχικού άνθρακα ( $<10$  g·L<sup>-1</sup>) με υπόστρωμα τη γλυκερόλη έδειξαν την υψηλότερη απόδοση σε ηλεκτρικό οξύ, 1,2 g·g<sup>-1</sup> γλυκερόλης, και τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού 6,4 g·L<sup>-1</sup> σε σχέση με τα υπόλοιπα υποστρώματα. Εκτός από το ηλεκτρικό οξύ, παράχθηκαν επίσης οξικό και μυρμηκικό οξύ και η αναλογία σε g ηλεκτρικού οξέος προς άθροισμα g οξικού και μυρμηκικού οξέος αντιστοιχούσε σε 9,1 προς 1. Τέλος, οι ερευνητές εξέτασαν την ακατέργαστη γλυκερόλη ως υπόστρωμα από διάφορα εργοστάσια βιοκαυσίμων. Ανακάλυψαν ότι η ακατέργαστη γλυκερόλη μπορεί να έχει θετική επίδραση στη βιοδιεργασία καθώς τόσο η παραγωγικότητα όσο και η τελική συγκέντρωση του ηλεκτρικού ήταν υψηλότερες από τις τιμές που λήφθηκαν από την καθαρή γλυκερόλη. Αυτό το στέλεχος DD1, έχει απομονωθεί από την μεγάλη κοιλία μηρυκαστικών και έχει χαρακτηριστεί από τους Kuhnert *et al.* (2010) ως *Basfia succiniciproducens*.

Το στέλεχος JF4016 είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, καπνόφιλο, gram-αρνητικό και αναπτύσσεται στους 37 °C. Οι αποικίες έχουν διάμετρο 0,1-0,5 μm, είναι λαμπερές και γκριζωπού χρώματος μετά από 24 ώρες. Τα κύτταρα είναι μη

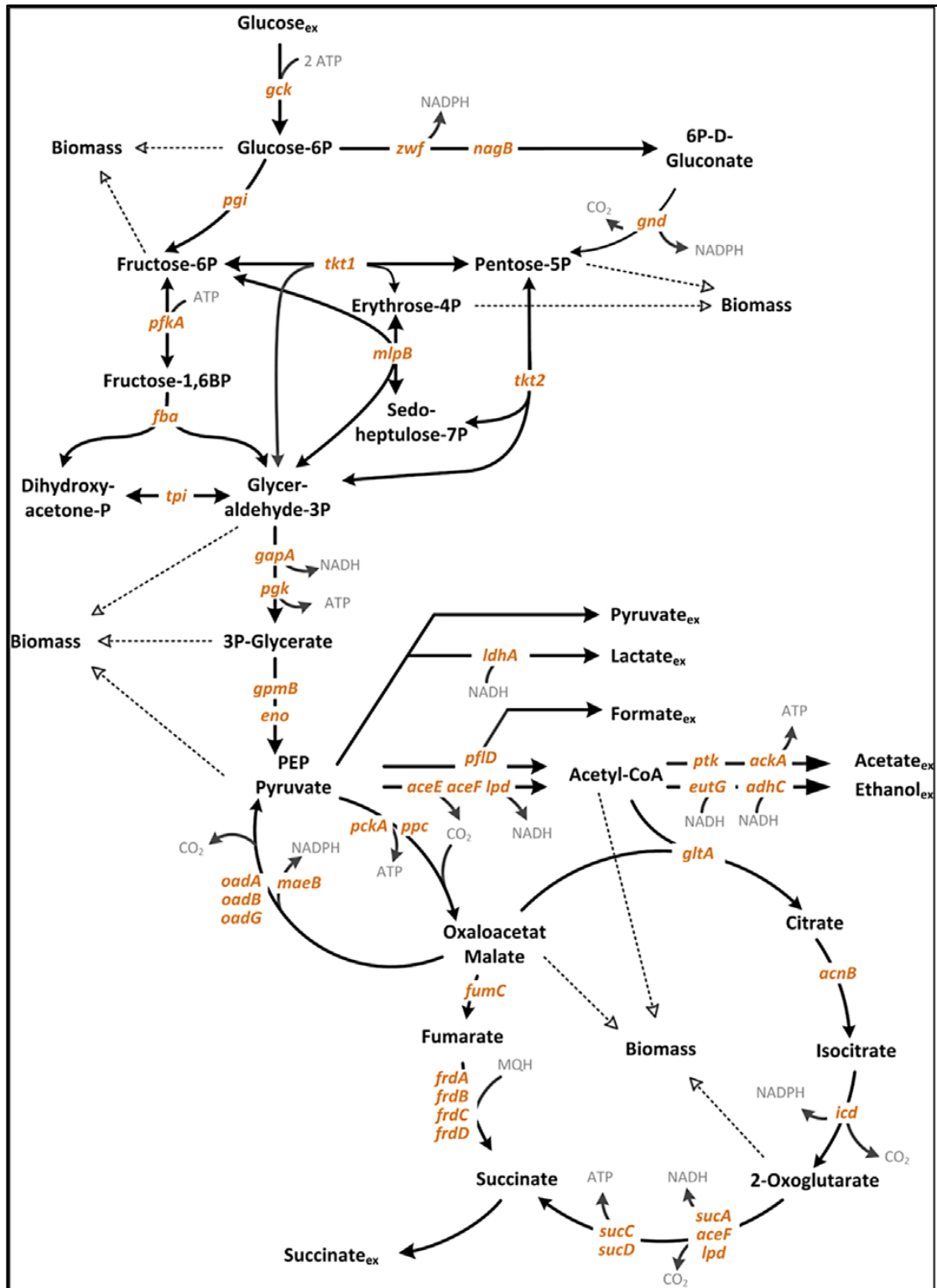
κινητικά, κοκκοειδή και ραβδοειδούς σχήματος όπως φαίνεται στην *εικόνα 1.14* μετά από χρώση κατά Gram του βακτηρίου. Το βακτήριο αυτό είναι μη-αιμολυτικό και είναι θετικό στην οξειδάση και αρνητικό για καταλάση, ουρεάση, ινδόλη και α-γλυκοσιδάση. Η περιεκτικότητα σε βάσεις G+C του DNA του στελέχους αυτού είναι 42,5% mole (Kuhnert *et al.*, 2010).



*Εικόνα 1.14: Εικόνα από το μικροσκόπιο του στελέχους JF4016 με χρώση Gram*

Το βακτήριο *B. succiniciproducens* παράγει ηλεκτρικό οξύ υπό αναερόβιες συνθήκες με την παρουσία ενός υποστρώματος όπως γλυκερόλη ή γλυκόζη (Kuhnert *et al.*, 2010). Το βιοχημικό μονοπάτι μεταβολισμού της γλυκόζης που ακολουθεί (*εικόνα 1.15*) είναι παρόμοιο με αυτό του *A. succinogenes* με τη διαφορά πως δύναται να παραχθεί ηλεκτρικό οξύ και από το αναγωγικό και από το οξειδωτικό τμήμα του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA). Ακόμα έχει βρεθεί πως ως παραπροϊόντα παράγει εκτός από αιθανόλη, μυρμηκικό και οξικό οξύ και γαλακτικό οξύ (Becker *et al.*, 2013).

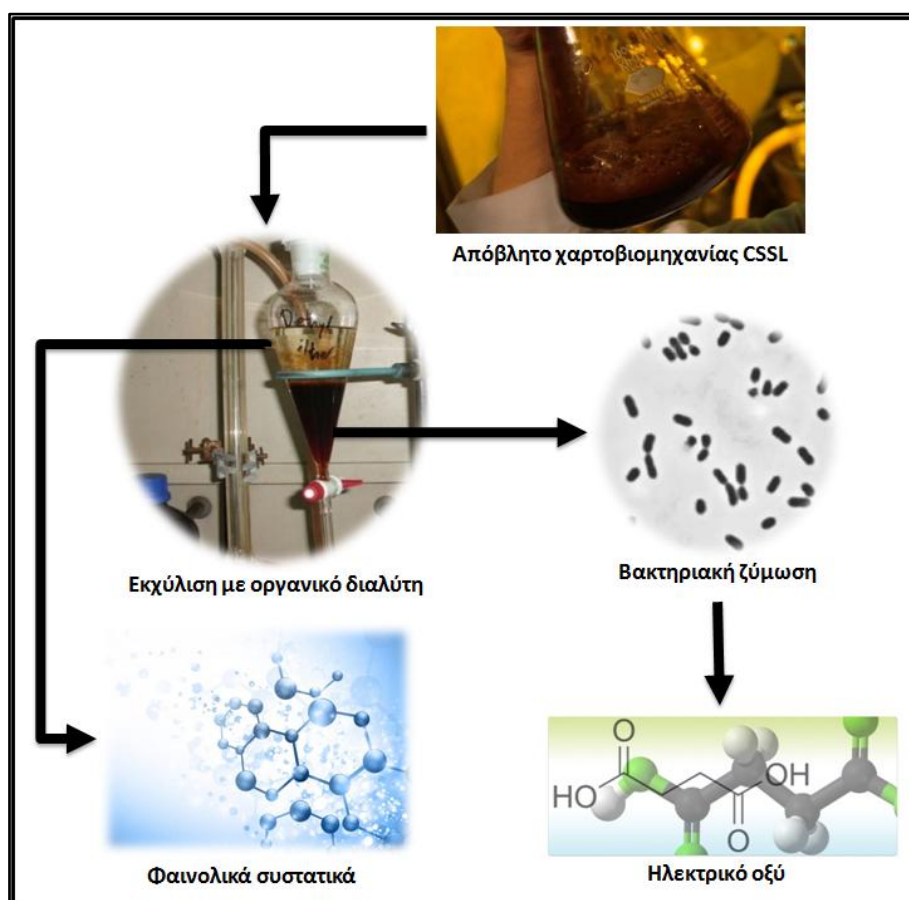




Εικόνα 1.15: Βιοχημικό μονοπάτι μεταβολισμού της γλυκόζης του βακτηρίου *Bacillus succiniciproducens* (Becker et al., 2013)

## 2. Σκοπός μελέτης και συνοπτική περιγραφή των πειραμάτων

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο διαχωρισμός και η ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των φαινολικών συστατικών με αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς και η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακής ζύμωσης για την αξιοποίηση του αποβλήτου χαρτοβιομηχανίας Concentrated Spent Sulphite Liquor (CSSL). Από τη μία τα φαινολικά συστατικά αποτελούν ουσίες με υψηλή προστιθέμενη αξία και από την άλλη οι υψηλές συγκεντρώσεις αυτών στο απόβλητο CSSL δρουν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών και την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Συνιστάται, λοιπόν, η ανάκτησή τους από το απόβλητο πριν αυτό χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα σε ζυμώσεις. Καινοτομία της μελέτης αυτής είναι η ταυτόχρονη αξιοποίηση του αποβλήτου ως πηγή φαινολικών συστατικών με αντιοξειδωτική ικανότητα και ως θρεπτικό μέσο για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω ζύμωσης με χρήση βακτηρίων, αφού κάτι ανάλογο δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν

Συνοπτικά η πορεία των πειραμάτων που έλαβε χώρα είναι η παρακάτω:

- Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σειρά εκχυλίσεων με οργανικούς διαλύτες, εύκολα ανακτήσιμους με εξάτμιση υπό κενό, για το διαχωρισμό των φαινολικών συστατικών από το απόβλητο.
- Ακολούθησε προσδιορισμός των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH• και ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών με HPLC.
- Στη συνέχεια, παράχθηκε ηλεκτρικό οξύ μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με θρεπτικό μέσο το απόβλητο CSSL ως έχει αλλά και προεπεξεργασμένο (χωρίς φαινολικά συστατικά) με τη χρήση των βακτηρίων *Actinobacillus succinogenes* και *Basfia succiniciproducens*.
- Τέλος, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με το βακτήριο *A. succinogenes* σε μίγμα καθαρών σακχάρων με προσθήκη γαλλικού οξέος ως παρεμποδιστική ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις για να εξεταστεί η επίδρασή του στην ανάπτυξη των κυττάρων και στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1. Διαχωρισμός, ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών συστατικών

Η απομόνωση των φαινολικών συστατικών από το απόβλητο πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση υγρού-υγρού. Η εκχύλιση με οργανικό διαλύτη είναι μία από τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες μεθόδους διαχωρισμού μεταξύ δύο υγρών φάσεων με ευρύτατη εφαρμογή σε μεγάλη ποικιλία συστατικών και δειγμάτων. Η ευρεία χρήση της οφείλεται στην ταχύτητα εκτέλεσης, στην απλότητα και το χαμηλό κόστος καθώς και στη δυνατότητα εφαρμογής της στη μικρο- και στη μακρο-ανάλυση ουσιών. Στην Οργανική Χημεία η διαδικασία της εκχύλισης είναι μια από τις κυριότερες εργαστηριακές τεχνικές. Η επεξεργασία ενός ακατέργαστου μίγματος περιλαμβάνει συνήθως απλές εκχυλίσεις για τη μεταφορά των οργανικών ενώσεων σε έναν οργανικό διαλύτη (Σίσκος & Νικολέλης, 2005).

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για να εκτιμηθεί η συνολική ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν σε ένα εκχύλισμα, αλλά είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη ότι καμία από αυτές τις μεθόδους δεν ανιχνεύει όλες τις φαινολικές ενώσεις. Κατά συνέπεια, είναι συχνά απαραίτητο να εκτελούνται διάφορες αναλύσεις (Vermerris & Nicholson, 2008). Στην παρούσα μελέτη η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε με χρωματομετρικές μεθόδους (Aksoy *et al.*, 2013), όπως και ο βαθμός αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους, και η ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων έλαβε χώρα με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με συστοιχία διόδων για ανίχνευση (HPLC-DAD). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Blainski *et al.*, 2013). Τέλος, για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση των αντιοξειδωτικών με τη σταθερή έγχρωμη ελεύθερη 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλική ρίζα (DPPH<sup>•</sup>), η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό της ρίζας αυτής (Molyneux, 2004).

##### 3.1.1. Πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλυτικές μεθόδους

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν το πυκνό, καφέ σκούρου χρώματος, απόβλητο της βιομηχανίας χαρτοπολτού και χάρτου, CSSL το οποίο προμηθεύτηκε από την εταιρεία Green Source της Ισπανίας. Αποθηκεύτηκε σε ειδικό δοχείο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) και στη συνέχεια αναλύθηκε στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για να προσδιοριστεί

η σύστασή του, όπως φαίνεται αναλυτικά στον παρακάτω *πίνακα 3.1*. Τα περιεχόμενα λιγνοσουλφονικά και φαινολικά συστατικά αναλύθηκαν βάσει του προτύπου EN 16109, το οποίο περιγράφεται παρακάτω, ήταν  $458,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Pateraki *et al.*, 2013) και  $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , αντίστοιχα. Η ποσότητα των σακχάρων με έξι και πέντε άνθρακες που περιέχονταν στο CSSL αναλύθηκαν με HPLC. Η συγκέντρωση των συνολικών σακχάρων ήταν  $176,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Pateraki *et al.*, 2013).

*Πίνακας 3.1: Ανάλυση του αποβλήτου CSSL*

<b>Ανάλυση του αποβλήτου CSSL</b>	
<b>pH</b>	2,6
<b>Λιγνοσουλφονικά (<math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	458,8
<b>Φαινολικά (<math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	12,0
<b>Σάκχαρα (<math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	176,41
<b>Ξυλόζη (<math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	128,08
<b>Γαλακτόζη (<math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	21,47
<b>Γλυκόζη (<math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	19,27
<b>Μαννόζη (<math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	7,41
<b>Αραβινόζη (<math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	0,18

### 3.1.2. Διαλύτες και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην εκχύλιση

Για την ρύθμιση του pH χρησιμοποιήθηκε HCl 5M, ενώ για να αποφευχθεί ο έντονος αφρισμός προστέθηκε 5% αντιαφριστικός παράγοντας (antifoam). Το πρώτο αντιδραστήριο παρασκευάστηκε από πυκνό διάλυμα HCl 37% (Sigma-Aldrich) και το δεύτερο από antifoam A (Desmophen, Sigma-Aldrich) με συγκέντρωση  $1\text{-}50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  με κατάλληλη αραίωση, αντίστοιχα. Για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο οξικός αιθυλεστέρας, το χλωροφόρμιο, ο διαιθυλαιθέρας, το τριχλωροαιθυλένιο και το βενζόλιο (Sigma-Aldrich). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Sigma-Aldrich) για να επαναδιαλυθούν τα φαινολικά συστατικά μετά από την ανάκτηση του διαλύτη.

### 3.1.3. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Για την μέθοδο Folin-Ciocalteu χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, FC, 2N (Merck), γαλλικό οξύ (Sigma-Aldrich), μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Sigma-Aldrich) και υδατικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου 7,5% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5%), το οποίο είναι σταθερό για αρκετές ημέρες.

### 3.1.4. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο DPPH•

Για την μέθοδο DPPH• (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλ-υδραζίλιο) χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο DPPH• (Sigma-Aldrich), γαλλικό οξύ (Sigma-Aldrich) και μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Sigma-Aldrich).

### 3.1.5. Πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την HPLC-DAD

Οι πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό της παρούσας διατριβής παρατίθενται στον πίνακα 3.2 που ακολουθεί.

*Πίνακας 3.2: Πρότυπες φαινολικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν*

Φαινολικές ενώσεις	Εταιρεία
3,4-Διυδροξυφαινυλοξικό οξύ, γαλλικό οξύ, 1,2-διϋδρόξυ βενζόλιο, κατεχίνη, 4-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ, γεντισικό οξύ, 4-υδρόξυ βενζαλδεΐδη, βανιλίνη, βανιλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, γουαϊκόλη, συριγγικό οξύ, συριγγαλδεΐδη, ακετοσυριγγόνη, φερουλικό οξύ, ταξιφολίνη, 2-υδρόξυ κινναμωμικό οξύ, λαρισιρεσινόλη, ρουτίνη, ελλαγικό οξύ, trans-κινναμωμικό οξύ, εριοδικτυόλη, ροσμαρινικό οξύ, ναρινγκενίνη, κερκετίνη, λουτεολίνη, ισοραμεντίνη	Sigma-Aldrich

### 3.1.6. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για το πρότυπο EN 16109

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των λιγνοσουλφονικών, των φαινολικών -OH και των στερεών είναι HCl 5 M και 0,2 M τα οποία παρασκευάστηκαν από πυκνό διάλυμα HCl 37% (Sigma-Aldrich) και NaOH

σε συγκεντρώσεις 5 M και 0,125 M τα οποία παρασκευάστηκαν έπειτα από ζύγιση κατάλληλης ποσότητας στερεού NaOH σε ζυγό ακριβείας τύπου Sartorius basic και διάλυση αυτού σε απιονισμένο νερό.

### 3.1.7. Αραίωση και ρύθμιση του pH

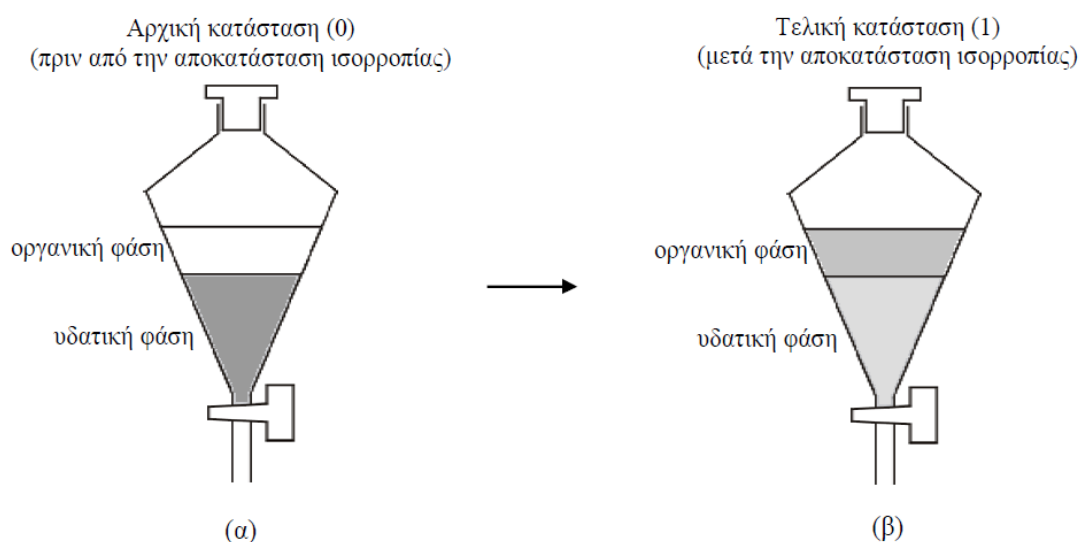
Σύμφωνα με τους Faustino *et al.* (2010), που πραγματοποίησαν εκχύλισεις με οξικό αιθυλεστέρα σε αραιωμένο 1:10 CSSL, παρατηρήθηκε ότι σε pH=2 το εκχύλισμα παρουσιάζει την μεγαλύτερη τιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας AAI. Αρχικά, λοιπόν, το CSSL αραιώθηκε δέκα φορές με απιονισμένο νερό. Σε ποτήρι ζέσεως 2 L προστέθηκαν 900 mL απιονισμένο H<sub>2</sub>O και 100 mL CSSL και αναδεύτηκαν για να επιτευχθεί ομογενοποίηση του διαλύματος. Ακόμα, χρειάστηκε η προσθήκη αντιαφριστικού για να αποφευχθεί ο έντονος αφρισμός. Το pH μετρήθηκε με πεγάμετρο τύπου Jenway 3020 pH meter και ρυθμίστηκε προσθέτοντας HCl 5 M σε pH=2, υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου.

### 3.1.8. Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη

Η εκχύλιση υγρού-υγρού με οργανικό διαλύτη, στηρίζεται στη διαφορά διαλυτότητας μιας ουσίας σε δεδομένη θερμοκρασία και πίεση στους διάφορους διαλύτες. Με την εκχύλιση συνήθως παραλαμβάνουμε μία ουσία από ένα υδατικό διάλυμα σε κάποιο οργανικό διαλύτη στον οποίο η συγκεκριμένη ένωση παρουσιάζει μεγαλύτερη διαλυτότητα στη θερμοκρασία περιβάλλοντος σε σχέση με τη διαλυτότητά της στο νερό. Η εκχύλιση είναι κατάλληλη για την απομόνωση ουσιών από διαλύματα ή στερεά μίγματα, για διαχωρισμό ουσιών όπως και για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων προσμίξεων (έκπλυση). Βασίζεται στο νόμο κατανομής, σύμφωνα με τον οποίο όταν σε ένα σύστημα δύο υγρών που δεν αναμιγνύονται, προστεθεί μία ουσία διαλυτή και στα δύο υγρά, τότε η ουσία αυτή κατανέμεται μεταξύ των δύο, έτσι ώστε ο λόγος των συγκεντρώσεων της ουσίας στους δύο διαλύτες, στην ισορροπία, να είναι σταθερός σε σταθερή θερμοκρασία (Dean, 2009).

Η όλη διαδικασία της εκχύλισης παρουσιάζεται παραστατικά στην *εικόνα 3.1*. Έστω ότι ποσότητα ουσίας είναι διαλυμένη στην υδατική φάση (κάτω φάση). Προστίθεται καθαρός οργανικός διαλύτης και επειδή τα υγρά είναι μη αναμίξιμα μεταξύ τους, σχηματίζουν δύο στιβάδες με το πυκνότερο υγρό να αποτελεί την κάτω στιβάδα (*εικόνα 3.1.α*). Αναταράσσεται η διαχωριστική χοάνη έντονα και για κατάλληλο χρονικό διάστημα, οπότε η ουσία κατανέμεται μεταξύ των δύο φάσεων και επέρχεται κατάσταση ισορροπίας. Μετά το διαχωρισμό των φάσεων προκύπτει η

κατάσταση όπως φαίνεται στην *εικόνα 3.1.β*. Η ουσία, ενώ αρχικά βρισκόταν στη μία φάση, μετά την εκχύλιση υπάρχει και στις δύο φάσεις. Η κατανομή της ουσίας, δηλαδή ο λόγος των συγκεντρώσεών της στις δύο διαφορετικές στιβάδες, εξαρτάται από τη σχετική διαλυτότητά της στις δύο αυτές φάσεις (Μπακέας & Ευσταθίου, 2008).



*Εικόνα 3.1: Εκχύλιση υδατικού διαλύματος (κάτω στιβάδα) με οργανικό διαλύτη (επάνω στιβάδα) σε διαχωριστική χοάνη. (α) Αρχική κατάσταση (0), (β) Τελική κατάσταση (1) (μετά την ανατάραξη, αποκατάσταση ισορροπίας κατανομής και διαχωρισμό των φάσεων). Οι αριθμοί 0 και 1 δείχνουν πόσες εκχυλίσεις έχει υποστεί το αρχικό υδατικό διάλυμα (Μπακέας& Ευσταθίου, 2008)*

#### 3.1.8.1. Πορεία της εκχύλισης με οργανικό διαλύτη

Πραγματοποιήθηκε ανάμιξη σε αναλογία 1:3 v/v δέκα φορές αραιωμένου CSSL με διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες, τον οξικό αιθυλεστέρα, το χλωροφόρμιο, τον διαιθυλαιθέρα, το τριχλωροαιθυλένιο και το βενζόλιο. Η διαδικασία της εκχύλισης σε ένα στάδιο έλαβε χώρα κάτω από την απαγωγό διότι οι διαλύτες ήταν πτητικοί. Προστέθηκαν 600 mL διαλύτη σε 200 mL αραιωμένου 1:10 CSSL σε φιάλη Duran 1 L και αφέθηκε το μίγμα για 30 λεπτά να ανακινηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε 5 λεπτά η φιάλη ανοιγόταν για να εκτονωθεί το περιεχόμενο υγρό. Στη συνέχεια, το μίγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη του 1 L και διατηρήθηκε ο απαιτούμενος χρόνος για να επέλθει ισορροπία και να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Περίπου 15 λεπτά ήταν αρκετά για την αποκατάσταση της ισορροπίας.

Η υδατική φάση, η οποία αποτελούνταν από το CSSL χωρίς ορισμένη ποσότητα φαινολικών συστατικών αλλά με υπολείμματα από το διαλύτη, ήταν



αναγκαίο να συμπυκνωθεί μέχρι το 10% του όγκου της. Με εξάτμιση υπό κενό σε περιστροφικό εξάτμιστήρα (BUCHI Waterbath B-480, BUCHI Rotavapor R-114) στους 70 °C εξασφαλίστηκε η απομάκρυνση των υπολειμμάτων των διαλυτών έτσι ώστε να είναι εφικτό να χρησιμοποιηθούν τα εκχυλισμένα υδρολύματα στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια. Η διαδικασία της συμπύκνωσης της υδατικής φάσης έγινε μόνο για τις εκχυλίσεις με τους διαλύτες οξικό αιθυλεστέρα και χλωροφόρμιο.

Ο διαλύτης με τα φαινολικά που εκχυλίστηκαν, μεταφέρθηκε σε στεγνή και προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης των 500 mL. Με περιστροφική εξάτμιση υπό κενό στους 40 °C ανακτήθηκε ο διαλύτης και τα φαινολικά συστατικά παρέμειναν στα τοιχώματα της φιάλης. Η φιάλη εξάτμισης στη συνέχεια τυλίχτηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα στον οποίο παρέμεινε για περίπου 12-15 h. Ζυγίστηκε η φιάλη και τα φαινολικά συστατικά συλλέχθηκαν επαναδιαλύοντάς τα σε μεθανόλη. Στη συνέχεια, αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη σε γυάλινους περιέκτες των 10 mL, οι οποίοι σφραγίστηκαν επιπλέον και με parafilm, για την περαιτέρω ποσοτική και ποιοτική ανάλυση.

Η εκχύλιση με τον οξικό αιθυλεστέρα πραγματοποιήθηκε, επίσης, σε δύο και σε τρία στάδια χρησιμοποιώντας την ήδη εκχυλισμένη υδατική φάση (εκχυλισμένο CSSL) από το προηγούμενο στάδιο κάθε φορά ακολουθώντας ακριβώς την ίδια παραπάνω διαδικασία. Και στα τρία στάδια προστέθηκε ο ίδιος όγκος διαλύτη. Τέλος, εξετάστηκε η περίπτωση διαφορετικής αναλογίας. Αναμίχθηκε, σε αναλογία 1:2 v/v, αραιωμένο CSSL με οξικό αιθυλεστέρα και η διαδικασία της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε, ομοίως όπως και στην περίπτωση της αναλογίας 1:3 v/v, σε ένα, δύο και τρία στάδια. Όλες οι εκχυλίσεις έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

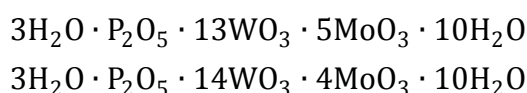
### 3.1.9. Χρωματογραφικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων (Folin-Ciocalteu)

Με τον όρο φαινολικές ενώσεις, ονομάζεται μια κατηγορία χημικών ενώσεων οι οποίες αποτελούνται από έναν βενζολικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Μέσω χρωματομετρικής οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, πραγματοποιείται προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου ενός εκχυλίσματος χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών (Blainski *et al.*, 2013; Waterhouse *et al.*, 2002).

### 3.1.9.1. Αρχή της μεθόδου Folin-Ciocalteu

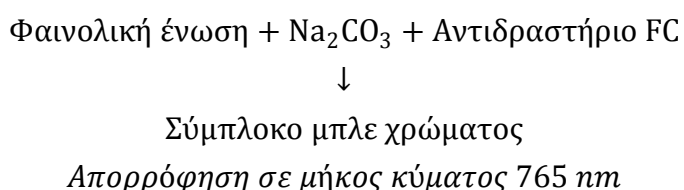
Η μέθοδος Folin-Ciocalteu έχει ως στόχο τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών συστατικών τόσο *in vitro* σε τρόφιμα, όσο και *in vivo* σε βιολογικά υγρά. Η μέθοδος αυτή προτάθηκε αρχικά για την ανάλυση πρωτεϊνών επωφελούμενη από τη δραστικότητα του αντιδραστηρίου που χρησιμοποιεί έναντι στο πρωτεϊνικό κατάλοιπο της τυροσίνης, η οποία περιέχει μία φαινυλομάδα (Vermeiris & Nicholson, 2008). Τα ολικά φαινολικά που περιέχονται στα φυτά προσδιορίζονται με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου υπεριώδους - ορατού (UV-vis) διπλής δέσμης και μέτρηση της απορρόφησης στα 765 nm (Faustino *et al.*, 2010).

Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων με ταυτόχρονη αναγωγή του διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος (αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu) με τις ακόλουθες δομές (σχέση 3.1):



Σχέση 3.1: Δομές φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος

σε φωσφορομολυβδενικό/φωσφοροβολφραμικό-φαινολικό σύμπλοκο, μπλε χρώματος σε αλκαλικό περιβάλλον (σχέση 3.2) (Cicco *et al.*, 2009).



Σχέση 3.2: Οξείδωση φαινολικών ενώσεων με ταυτόχρονη αναγωγή του αντιδραστηρίου FC

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών γίνεται συνήθως με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα μάζας γαλλικού οξέος ανά όγκο αρχικού διαλύματος ή μάζα ξηρού δείγματος (g GAE/L ή g). Η ταυτοποίηση της κάθε φαινολικής ένωσης ξεχωριστά δεν είναι δυνατή (Dai & Mumper, 2010).

Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών στα εκχυλίσματα οι οποίες έχουν προσδιοριστεί με βάση τη μέθοδο Folin-Ciocalteu δεν αποτελούν απόλυτες τιμές των ποσοτήτων των φαινολών στο εκχύλισμα αλλά στη πραγματικότητα βασίζονται στην αναγωγική τους ικανότητα αναφορικά ισοδύναμη με την αναγωγική ικανότητα του γαλλικού οξέος. Η επιλογή του γαλλικού οξέος ως πρότυπο βασίζεται στη διαθεσιμότητα μιας καθαρής και σταθερής ουσίας, και το γαλλικό οξύ τηρεί και τους δυο αυτούς παράγοντες και είναι σχετικά φθηνό (Dai & Mumper, 2010).

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι μη ειδικό στα φαινολικά συστατικά διότι μπορεί να αναχθεί και από άλλα μη φαινολικά συστατικά όπως η βιταμίνη C και ο Cu(I). Τα φαινολικά συστατικά αντιδρούν με το αντιδραστήριο μόνο υπό βασικές συνθήκες, γι' αυτό πραγματοποιείται ρύθμιση με διάλυμα ανθρακικού νατρίου σε pH 10. Ο ιοντισμός ενός φαινολικού πρωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό φαινολικού ανιόντος, το οποίο ανάγει το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Η αντίδραση αυτή υποστηρίζει τον μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίου. Οι κυανού χρώματος ενώσεις που σχηματίζονται, είναι ανεξάρτητες από τη δομή των φαινολικών συστατικών, αποκλείοντας την πιθανότητα σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ του κεντρικού μετάλλου και των φαινολικών συστατικών (Cicco *et al.*, 2009).

Η μέθοδος των ολικών φαινολών με χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu είναι απλή, επαναλήψιμη και αναπαραγωγίμη. Επιπλέον η συσχέτιση της μεθόδου Folin-Ciocalteu και των υπόλοιπων μεθόδων αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίου είναι πολύ μεγάλη (Li *et al.* 2009; Vázquez *et al.*, 2008). Για τους λόγους αυτούς η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συχνά στη μελέτη των φαινολικών αντιοξειδωτικών.

### 3.1.9.2. Πορεία της μεθόδου Folin-Ciocalteu

#### ☞ Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκαν διαλύματα γαλλικού οξέος συγκεντρώσεων από  $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  έως  $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ως εξής:

Από πρότυπο μητρικό διάλυμα γαλλικού οξέος  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  που παρασκευάστηκε με διάλυση  $0,2 \text{ g}$  γαλλικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των  $100 \text{ mL}$  σε μεθανόλη, μεταφέρθηκαν με χρήση μηχανικής πιπέτας  $2,5, 5, 10, 15$  και  $20 \text{ mL}$  σε αντίστοιχες ογκομετρικές φιάλες των  $50 \text{ mL}$ . Οι φιάλες συμπληρώθηκαν με μεθανόλη ως τη χαραγή και ομογενοποιήθηκαν με χρήση Vortex.

#### ↳ Προετοιμασία δείγματος

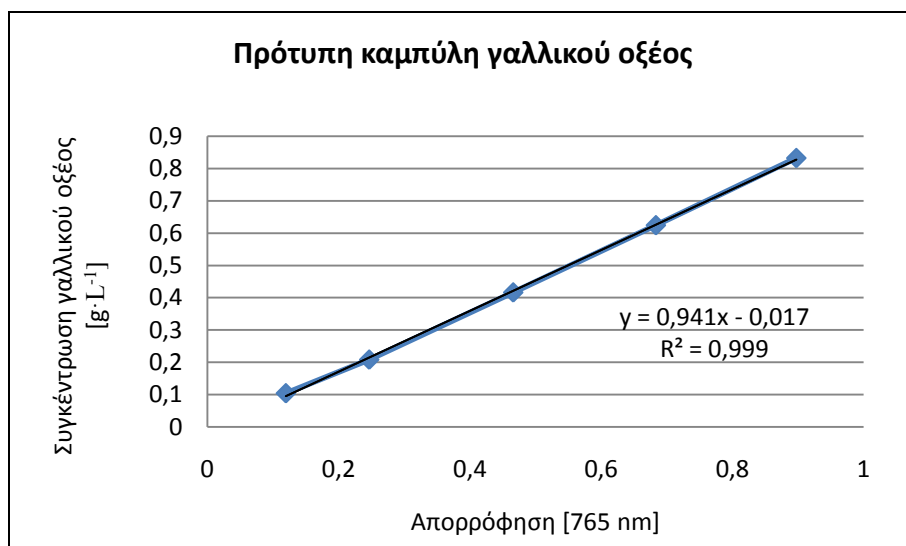
Στην ποσότητα φαινολικών που εκχυλίστηκε από 1 L δείγματος αραιωμένου CSSL προστέθηκαν 10 mL μεθανόλης. Από αυτό το διάλυμα μεταφέρθηκαν με χρήση μηχανικής πιπέτας οι κατάλληλες ποσότητες σε δοκιμαστικούς σωλήνες για να παρασκευαστούν οι αραιώσεις 1:100, 1:200 και 1:300 με μεθανόλη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση των διαλυμάτων με χρήση Vortex.

#### ↳ Μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων και δείγματος

50  $\mu$ L από τα πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος και 50  $\mu$ L από τις αραιώσεις του εκχυλίσματος (δείγμα) μεταφέρθηκαν σε αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκαν 450  $\mu$ L απιονισμένο  $H_2O$  στο καθένα. Σε καθένα από τα παραπάνω διαλύματα προστέθηκαν 2,5 mL από το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu και πραγματοποιήθηκε ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mL  $Na_2CO_3$  και τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα για 1,5 h στους 30 °C. Κατόπιν μετρήθηκε η απορρόφηση των προτύπων διαλυμάτων και των δειγμάτων στα 765 nm στο φασματοφωτόμετρο διπλής θέσεως τύπου Hitachi U-2000 (Hitachi, Tokyo, Japan) χρησιμοποιώντας πλαστικές κυψελίδες των 3 mL. Ως δείγμα αναφοράς για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε τα παραπάνω αντιδραστήρια αλλά αντί για 50  $\mu$ L δείγμα προστέθηκαν 50  $\mu$ L απιονισμένο νερό (τυφλό).

#### 3.1.9.3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών φαίνεται στο *γράφημα 3.1*. Ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων έγινε με τη χρήση της εξίσωσης:  $y = 0,941x - 0,017$  (με εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων), όπου x η απορρόφηση στα 765 nm και y η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών σε  $g\ GAE \cdot L^{-1}$ . Ο συντελεστής προσδιορισμού  $R^2$  της παραπάνω εξίσωσης, που δείχνει αν υπάρχει πλήρης γραμμική συσχέτιση στο δείγμα, ήταν 0,999.



Γράφημα 3.1: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού των ολικών φαινολικών συστατικών σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος σε  $g \cdot L^{-1}$ .

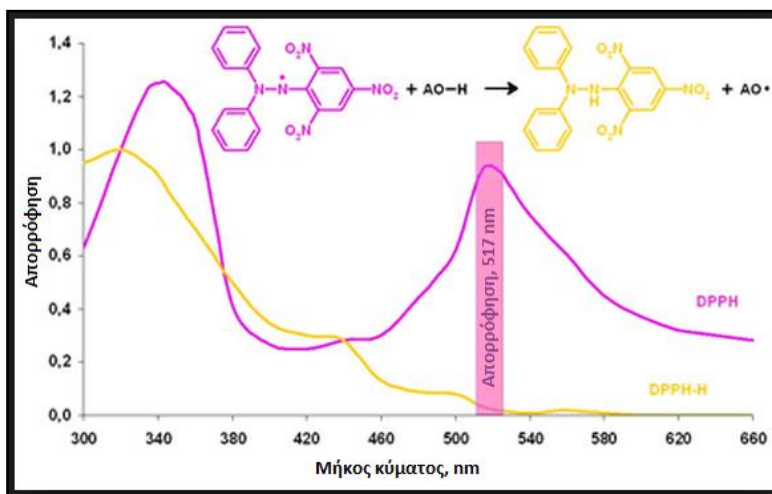
### 3.1.10. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών συστατικών (DPPH•)

Η αντιοξειδωτική ικανότητα είτε πρότυπης ουσίας, είτε εκχυλίσματος φυτού, είτε εκχυλίσματος αποβλήτου μπορεί να εκτιμηθεί με τη μέθοδο της DPPH• (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλική ρίζα). Η μέθοδος της DPPH• χρησιμοποιείται στην ποσοτικοποίηση της ικανότητας δέσμευσης των ελεύθερων ριζών και είναι η παλαιότερη μέθοδος για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Molyneux, 2004).

#### 3.1.10.1. Αρχή της μεθόδου DPPH•

Η δοκιμή DPPH• βασίζεται στην ικανότητα της σταθερής ελεύθερης ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζίλιο (DPPH•) να αντιδρά με αντιοξειδωτικές ενώσεις. Η αντίδραση βασίζεται στη μείωση του χρώματος που συμβαίνει όταν το αδέσμευτο ηλεκτρόνιο του ατόμου του αζώτου στην DPPH• ανάγεται κατά τη λήψη ενός ατόμου υδρογόνου από αντιοξειδωτικές ενώσεις. Η DPPH• είναι γνωστή ως σταθερή ελεύθερη ρίζα, αλλά είναι ευαίσθητη στο φως, το οξυγόνο, το pH, και τον τύπο του διαλύτη που χρησιμοποιείται (Ozcelik *et al.*, 2003). Τα φαινολικά συστατικά δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH• και η μείωση της ελέγχεται με τη μείωση της απορρόφησης στα 517 nm. Το χρώμα από μωβ στο αρχικό διάλυμα μετατρέπεται σε

κίτρινο (μείωση της έντασης του χρώματος) όταν όλο το ποσό της ελεύθερης ρίζας έχει δεσμευτεί από τα αντιοξειδωτικά (εικόνα 3.2) (Molyneux, 2004).



Εικόνα 3.2: Αντίδραση της ρίζας DPPH• με αντιοξειδωτικές ουσίες (Pérez & Aguilar, 2013).

Το ποσοστό αναστολής, I%, της δραστηρότητας της ρίζας DPPH• υπολογίζεται με τη βοήθεια της σχέσης 3.3 ως εξής:

$$I\% = \frac{(Abs_0 - Abs_1)}{Abs_0} \cdot 100$$

Σχέση 3.3: Ποσοστό αναστολής δραστηρότητας της ρίζας DPPH• (Faustino *et al.*, 2010)

Όπου,  $Abs_0$  είναι η απορρόφηση του διαλύματος αναφοράς και  $Abs_1$  είναι η απορρόφηση του δείγματος σε διάφορες συγκεντρώσεις κάθε φορά (Faustino *et al.*, 2010).

Ωστόσο, η πλειονότητα των μελετών εκφράζουν τα αποτελέσματα ως τιμή  $IC_{50}$ , η οποία ορίζεται ως η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που είναι αναγκαία για να μειωθεί η αρχική συγκέντρωση της DPPH• κατά 50% (Ani *et al.*, 2006; Elzaawely *et al.*, 2007; Sokmen *et al.*, 2004; Tepe *et al.*, 2005). Για να υπολογιστεί η τιμή  $IC_{50}$  (συγκέντρωση που παρέχει 50% αναστολή) χρησιμοποιείται μια καμπύλη βαθμονόμησης στη γραμμική περιοχή, με γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος ως προς το αντίστοιχο ποσοστό αναστολής της δραστηρότητας της

DPPH•, I% (Faustino *et al.*, 2010). Οπότε η *σχέση 3.4* που προκύπτει από τη γραφική παράσταση, από δύο τιμές εκατέρωθεν του I%=50, έστω I<sub>1</sub> και I<sub>2</sub>, είναι η εξής:

$$IC_{50} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{C_1 \cdot (50 - I\%_2) - C_2 \cdot (50 - I\%_1)}{I\%_1 - I\%_2} \cdot 1000$$

*Σχέση 3.4: Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού που παρέχει 50% αναστολή της δραστηριότητας της ρίζας DPPH•*

Όπου, C<sub>1</sub> και C<sub>2</sub> είναι οι συγκεντρώσεις στις κυψελίδες σε g·L<sup>-1</sup>.

Παρά την παγκόσμια χρήση της μεθόδου DPPH•, η έλλειψη τυποποίησης των αποτελεσμάτων καθιστά δύσκολη τη σύγκριση της αντιοξειδωτικής ισχύος των διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων, καθώς και των καθαρών ενώσεων. Για τα εκχυλίσματα φυτών ή καθαρών ενώσεων τα δεδομένα που παρουσιάζονται, όπως το I% ή η τιμή IC<sub>50</sub>, τροποποιούνται ανάλογα με την τελική συγκέντρωση της DPPH• που χρησιμοποιείται. Ως εκ τούτου, οι Scherer και Godoy (2009) πρότειναν ένα νέο δείκτη αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (antioxidant activity index, AAI) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DPPH•. Ο δείκτης αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (AAI), υπολογίζεται ως εξής (*σχέση 3.5*):

$$AAI = \frac{\text{Τελική συγκέντρωση της DPPH• σε } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}}{IC_{50} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})}$$

*Σχέση 3.5: Δείκτης αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (Scherer & Godoy, 2009)*

Έτσι, ο δείκτης AAI αντιπροσωπεύει μια σταθερά για κάθε ένωση, ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση της DPPH• και του δείγματος που χρησιμοποιείται. Στην εργασία των Scherer και Godoy (2009) θεωρείται ότι φυτικά εκχυλίσματα έχουν πολύ μικρή αντιοξειδωτική ικανότητα όταν AAI<0,5, μέτρια αντιοξειδωτική ικανότητα όταν ο AAI έχει τιμή μεταξύ 0,5 και 1, ισχυρή αντιοξειδωτική δράση όταν ο AAI έχει τιμή μεταξύ 1 και 2, και πολύ ισχυρή όταν AAI>2.

### 3.1.10.2. Πορεία της μεθόδου DPPH•

#### ↳ Προετοιμασία διαλύματος DPPH•

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL προετοιμάστηκε διάλυμα DPPH• συγκέντρωσης 81,2  $\mu\text{M}$  ( $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) διαλυμένο σε μεθανόλη. Επειδή αυτό το αντιδραστήριο οξειδώνεται εύκολα με το φως ήταν απαραίτητο να καλυφθεί η φιάλη με αλουμινόχαρτο.

#### ↳ Προετοιμασία και μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων και δείγματος

Προετοιμάστηκαν πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος και trolox, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM και 1,5 mM, για τον καθορισμό του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας (AAI). Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις για το δείγμα ώστε οι απορροφήσεις να δίνουν τιμή I% που να πλησιάζει την τιμή 50. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 0,1 mL δείγματος και 3,9 mL διαλύματος DPPH•. Στην περίπτωση του διαλύματος αναφοράς για το μηδενισμό του οργάνου προστέθηκε 0,1 mL μεθανόλης αντί για το δείγμα και 3,9 mL διαλύματος DPPH•. Όλα τα δείγματα προετοιμάστηκαν εις διπλούν και παρέμειναν σε σκοτεινό χώρο για 90 λεπτά. Κατόπιν μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος αναφοράς, των δειγμάτων και των προτύπων στο φασματοφωτόμετρο διπλής θέσεως τύπου Hitachi U-2000 (Hitachi, Tokyo, Japan) σε μήκος κύματος 517 nm, χρησιμοποιώντας τις πλαστικές κυψελίδες των 1,5 mL.

### 3.1.11. Ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών με HPLC-DAD

Σε ό,τι αφορά το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό φαινολικών συστατικών τα τελευταία χρόνια εφαρμόζονται σχεδόν αποκλειστικά μέθοδοι αναλυτικής χρωματογραφίας. Κατόπιν αποδοχής του Οργανισμού Αναλυτικής Χημείας, η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού αποτελεί την πρώτιστη μέθοδο ανάλυσης για δεδομένες αναλύσεις (Romani *et al.*, 1999). Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (τις περισσότερες φορές αναφέρεται ως υψηλής απόδοσης), είναι μία χρωματογραφική τεχνική που μπορεί να διαχωρίσει ένα μίγμα ενώσεων και χρησιμοποιείται στην Αναλυτική Χημεία για τον εντοπισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση μεμονωμένων συστατικών του μίγματος (Vermeris & Nicholson, 2008).



### 3.1.11.1. Αρχή μεθόδου της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής (φέρουσας) που βρίσκονται μέσα στην χρωματογραφική στήλη. Η αρχή της χρωματογραφίας είναι παρόμοια με αυτή της εκχύλισης. Ουσίες που κατανέμονται περισσότερο στην κινητή φάση διαχωρίζονται διαδοχικά από άλλες που κατανέμονται στη στατική φάση. Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των συστατικών ενός μίγματος, όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα ή το μέγεθος των μορίων. Η κινητή φάση καθώς διέρχεται μέσα από την χρωματογραφική στήλη προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μίγματος επάνω στη στατική φάση, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος και την έξοδό τους από την στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Στην έξοδο της στήλης υπάρχει σύστημα ανίχνευσης και καταμέτρησης της ποσότητας του κάθε συστατικού και άρα πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός (Γαραντίλης & Πολυσίου, 2008).

### 3.1.11.2. Χαρακτηριστικά και συνθήκες του χρωματογράφου

Το σύστημα HPLC-UV-Vis, που χρησιμοποιήθηκε, είναι ένα όργανο της Jasco που χρησιμοποιεί ανιχνευτή συστοιχίας διόδων, UV-Vis (MD-910 Jasco), αντλία (PU-2089) και αυτόματο δειγματολήπτη Jasco AS-1555. Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε μέσω μιας στήλης αντίστροφης φάσης Waters Nova-Pack C18 (3.9 mm x 150 mm, 4 μm) σε θερμοκρασία δωματίου. Η κινητή φάση αποτελούνταν από υδατικό διάλυμα με 0,1% v/v υπερχλωρικού οξέος (διαλύτης A) και καθαρή μεθανόλη (διαλύτης B).

Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 100 % A 0-5 λεπτά, 90% A/ 10 % B 5-15 λεπτά, 82.5 % A/ 17.5 % B 15-25 λεπτά, 75 % A / 25% B 25-45 λεπτά, 40 %A/ 60 % B 45-60 λεπτά, 100 % B 60-80 λεπτά, 100 % A 80-85 λεπτά. Ο ρυθμός ροής ήταν  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  και ο όγκος έγχυσης ήταν 20μL. Παρακολούθηθηκαν δύο μήκη κύματος 280 και 320 nm. Πρότυπα διαλύματα των 15, 25, 50 και  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  σε μεθανόλη προετοιμάστηκαν για να κατασκευαστούν οι καμπύλες βαθμονόμησης. Το εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε με αραιώση σε μεθανόλη 1:2 και 1:10 ήταν από την εκχύλιση σε ένα στάδιο με οξικό αιθυλεστέρα με αναλογία αποβλήτου προς διαλύτη 1:3 v/v. Η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίστηκε στο συνδυασμό του χρόνου έκλυσης και του υπεριώδους και ορατού φάσματος. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση των εξαγόμενων κορυφών με αυτές των προτύπων.

### 3.1.11.3. Πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης

Οι φαινολικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες και οι αντίστοιχες εξισώσεις των καμπυλών βαθμονόμησης παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3. Στις παρακάτω γραμμικές σχέσεις με εξίσωση της μορφής  $y = ax + \beta$ , το  $x$  εκφράζει το εμβαδόν της κάθε κορυφής και το  $y$  τη συγκέντρωση της κάθε φαινολικής ένωσης σε  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Πίνακας 3.3: Πρότυπες φαινολικές ενώσεις και αντίστοιχες εξισώσεις καμπυλών βαθμονόμησης

Φαινολική ένωση	Εξίσωση ευθείας	Συντελεστής προσδιορισμού
3,4-Διυδροξυφαινολοξικό οξύ	$y = 22,29x$	$R^2 = 0,999$
Γαλλικό οξύ	$y = 1,223x$	$R^2 = 0,999$
1,2-Διυδροξύ βενζόλιο	$y = 2,912x$	$R^2 = 0,999$
Κατεχίνη	$y = 4,395x$	$R^2 = 0,993$
4-Υδροξύ βενζοϊκό οξύ	$y = 0,993x$	$R^2 = 0,982$
Γεντισικό οξύ	$y = 2,762x$	$R^2 = 0,990$
4-Υδροξύ βενζαλδεΐδη	$y = 0,487x$	$R^2 = 1$
Βανιλίνη	$y = 0,877x$	$R^2 = 0,998$
Βανιλλικό οξύ	$y = 0,949x$	$R^2 = 0,997$
Καφεϊκό οξύ	$y = 0,671x$	$R^2 = 0,999$
Γουαϊκόλη	$y = 3,770x$	$R^2 = 0,998$
Συριγγικό οξύ	$y = 1,125x$	$R^2 = 0,996$
Συριγγαλδεΐδη	$y = 1,081x$	$R^2 = 0,978$
Ακετοσυριγγόνη	$y = 1,501x$	$R^2 = 0,998$
Φερουλικό οξύ	$y = 0,686x$	$R^2 = 0,999$
Ταξιφολίνη	$y = 0,572x$	$R^2 = 0,848$
2-Υδροξύ κινναμωμικό οξύ	$y = 0,383x$	$R^2 = 0,984$
Λαρισιρεσινόλη	$y = 4,259x$	$R^2 = 0,981$
Ρουτίνη	$y = 1,847x$	$R^2 = 0,999$
Ελλαγικό οξύ	$y = 0,359x$	$R^2 = 0,993$
trans-Κινναμωμικό οξύ	$y = 0,474x$	$R^2 = 0,987$
Εριοδικτυόλη	$y = 1,118x$	$R^2 = 0,969$
Ροσμαρινικό οξύ	$y = 1,242x$	$R^2 = 0,998$
Ναρινγκενίνη	$y = 1,135x$	$R^2 = 0,998$
Κερκετίνη	$y = 1,111x$	$R^2 = 0,998$
Λουτεολίνη	$y = 0,719x$	$R^2 = 0,998$
Ισοραμνετίνη	$y = 0,829x$	$R^2 = 0,999$

### 3.1.12. Προσδιορισμός % των λιγνοσουλφονικών (LS), φαινολικών OH και στερεών (πρότυπο EN 16109)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των λιγνοσουλφονικών ουσιών (LS), των φαινολικών -OH και στερεών είναι μία φασματοφωτομετρική μέθοδος βάσει του προτύπου EN 16109. Ποσότητα δείγματος μετρημένου όγκου τοποθετήθηκε σε προζυγισμένη πυρίμαχη κάψα και στη συνέχεια σε φούρνο ξήρανσης (φούρνο Heraeus) στους 70 °C για 24 ώρες. Το ξηρό δείγμα ζυγίστηκε με σκοπό να βρεθεί η κατά βάρος περιεκτικότητα του υγρού δείγματος σε στερεά.

#### *3.1.12.1. Προετοιμασία διαλυμάτων*

Λήφθηκε ποσότητα δείγματος η οποία περιείχε μεταξύ 0,15 και 0,20 g ξηρού βάρους και το δείγμα τοποθετήθηκε σε ογκομετρικές φιάλες των 250 mL όπου προστέθηκε απιονισμένο νερό μέχρι πλήρωση των φιαλών και προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης μεταξύ 0,6 και 0,8 g·L<sup>-1</sup> ξηρού βάρους λιγνοσουλφονικών. Ακολούθησε ανάδευση για τουλάχιστον 20 min με μαγνητικό αναδευτήρα και ποσοτική διήθηση σε κωνικές φιάλες των 250mL (Διάλυμα S1).

Λήφθηκε ποσότητα από το διάλυμα S1 του οποίου το pH ρυθμίστηκε στο 2,0-2,2 με 5M HCl και 5 mL από αυτό το διάλυμα τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό (Διάλυμα S2). 3,5 mL από το διάλυμα S1 τοποθετήθηκαν σε δεύτερη ογκομετρική φιάλη των 50 mL και το pH ρυθμίστηκε στο 11 με 5 M NaOH και ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώθηκε και πάλι με απιονισμένο νερό (Διάλυμα S3).

Τέλος, προστέθηκαν 3 mL διαλύματος S1 σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL και απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 60 mL. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε μεταξύ 4,0 και 5,0 με 0,125 M NaOH ή 0,2 M HCl και στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, συμπληρώθηκε μέχρι αυτόν τον όγκο με απιονισμένο νερό και ανακινήθηκε (Διάλυμα S4).

#### *3.1.12.2. Φασματοφωτομετρική ανάλυση*

Η φασματοφωτομετρική ανάλυση έγινε σε UV-Vis φασματοφωτόμετρο διπλής θέσεως τύπου Hitachi U-2000 (Hitachi, Tokyo, Japan) με κυψελίδες χαλαζία και η πορεία που πραγματοποιήθηκε έχει ως εξής:

Προσθήκη απιονισμένου νερού και στις δύο κυψελίδες για να μηδενιστεί το όργανο. Πλήρωση της κυψελίδας του δείγματος με το διάλυμα S2, σάρωση σε μήκος

κύματος 340 έως 220 nm, καταγραφή της τιμής απορρόφησης της κορυφής μεταξύ 270 και 285 nm ως A. Στη συνέχεια, πλήρωση της κυψελίδας του δείγματος με το διάλυμα S3 και της κυψελίδας αναφοράς με το διάλυμα S2, σάρωση σε μήκος κύματος 340-220 nm, καταγραφή της απορρόφησης της κορυφής στα 255 nm ως B και της ελάχιστης κοιλιάδα εκατέρωθεν ως C. Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λιγνοσουλφονικά, η κυψελίδα δείγματος πληρώθηκε με διάλυμα S4 και η κυψελίδα αναφοράς με απιονισμένο νερό. Καταγράφηκε η απορρόφηση στα 232,5nm ως E.

Αυτή η διαδικασία είναι για προσδιορισμό των λιγνοσουλφονικών, LS, με συγκεντρώσεις μεταξύ 30 και 80 g·L<sup>-1</sup> ξηρού LS. Η τελική απορρόφηση του δείγματος πρέπει να είναι μεταξύ 0,2 και 0,8 για την ελαχιστοποίηση των αποκλίσεων από το νόμο του Beer και σφάλματος οργάνου. Το σφάλμα των διπλών δειγμάτων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 0,5%.

### 3.1.12.3. Υπολογισμοί

Οι μαθηματικές σχέσεις (σχέσεις 3.6-3.8), οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για να υπολογιστούν το ποσοστό των λιγνοσουλφονικών, το ποσοστό των υδροξυλομάδων των φαινολικών συστατικών και την ποσότητα των στερεών είναι οι εξής:

$$\%LS = \frac{E \cdot D \text{ (mL)}}{10 \cdot F \cdot P \text{ (g)}}$$

*Σχέση 3.6: Ποσοστό λιγνοσουλφονικών*

$$K_{\text{solids}} = \frac{A}{\text{Conc (g} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}}$$

*Σχέση 3.7: Ποσότητα στερεών*

$$\%OH_{\text{phenolics}} = \frac{B - C}{\text{Conc (g} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}} \cdot 0,192$$

*Σχέση 3.8: Ποσοστό υδροξυλομάδων των φαινολικών συστατικών*

Όπου:

Conc ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): συγκέντρωση των διαλυμάτων σε ξηρά LS

D: συντελεστής αραιώσης σε mL ( $D = \frac{100\cdot 250}{3}$ )

P: βάρος δείγματος σε g

F: συντελεστής που παίρνει την τιμή 35,2 για λιγνοσουλφονικό ασβέστιο

$K_{\text{solids}}$  : μέθοδος ανάλυσης των LS με UV που υπολογίζει την σχετική ποσότητα της περιεχόμενης λιγνίνης στο δείγμα.

### 3.2. Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων

Το ενδιαφέρον για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων από ανανεώσιμες πηγές έχει αυξηθεί κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, λόγω των περιβαλλοντικών και οικονομικών ανησυχιών (Corona-González *et al.*, 2008). Το ηλεκτρικό οξύ θεωρείται ένα πολλά υποσχόμενο «δομικό στοιχείο» για την παραγωγή διαφόρων χημικών ουσιών. Παρά το γεγονός ότι παράγεται κυρίως από πρόδρομες πετροχημικές ενώσεις, η παραγωγή του μέσω ζύμωσης έχει ήδη εφαρμοστεί σε βιομηχανίες, όπως η Bioamber και η Reverdia (Koutinas *et al.*, 2014).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πυκνό απόβλητο της βιομηχανίας χαρτοπολτού και χάρτου CSSL, το οποίο περιέχει ως πηγή άνθρακα πεντόζες και εξόζες. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί που επιλέχτηκαν για τις ζυμώσεις που ακολουθούν με σκοπό την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος είναι το βακτήριο *Actinobacillus succinogenes* και το βακτήριο *Basfia succiniciproducens*.

#### 3.2.1. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις

Το απόβλητο CSSL που χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη στο πειραματικό μέρος των ζυμώσεων προμηθεύτηκε από την εταιρεία Green Source της Ισπανίας, όπως ήδη προαναφέρθηκε. Η σύστασή του σε σάκχαρα ήταν  $176,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , σε φαινολικές ενώσεις  $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , σε λιγνοσουλφονικά  $458,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και σε οξικό οξύ  $6,91 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , όπως φαίνεται αναλυτικά στον πίνακα 3.1. Το απόβλητο αραιώθηκε δέκα φορές με νερό ώστε οι συγκεντρώσεις των συστατικών του να είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Πραγματοποιήθηκε, επίσης, μια σειρά ζυμώσεων με προεπεξεργασμένο CSSL. Χρησιμοποιήθηκε το απόβλητο αυτό, αφού πρώτα αφαιρέθηκε ποσότητα φαινολικών

συστατικών με εκχύλιση, τη μία φορά με οξικό αιθυλεστέρα και την άλλη με χλωροφόρμιο. Η ποσότητα των σακχάρων που περιέχονταν στο επεξεργασμένο CSSL αναλύθηκαν με HPLC και υπολογίστηκε η ποσότητα του αποβλήτου που χρειάστηκε ώστε η συγκέντρωση των συνολικών σακχάρων στο υγρό ζύμωσης να είναι  $17,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ίδια με αυτή του αραιωμένου 1:10 αποβλήτου.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε μίγμα καθαρών σακχάρων, ξυλόζης, γαλακτόζης, γλυκόζης, μαννόζης και αραβινόζης, με όμοιες συγκεντρώσεις με αυτές που είχαν προσδιοριστεί για το απόβλητο, αραιωμένο κατά δέκα φορές. Στο μίγμα των σακχάρων προστέθηκαν στη συνέχεια διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος,  $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### 3.2.2. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των βακτηριακών ζυμώσεων και οι εταιρείες από τις οποίες αυτά προμηθεύτηκαν αναγράφονται στον πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και προμηθευτές

Αντιδραστήρια	Εταιρείες
Γλυκόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, μαννόζη, αραβινόζη	Penta
TSB, Yeast extract, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , $\text{NaCl}$ , $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,	Lab M
$\text{MgCO}_3$ , αντιαφριστικό, HCl 7%, γαλλικό οξύ, 0,05 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ , καθαρή γλυκερόλη (99% καθαρότητας)	Sigma-Aldrich

### 3.2.3. Μικροοργανισμοί

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις ήταν το *Actinobacillus succinogenes* 130Z (DSM-22257) και το *Basfia succiniciproducens* JF 4016 (DSM-22022), τα οποία προμηθεύτηκαν από το Ινστιτούτο Leibniz DSMZ. Τα παραπάνω στελέχη έχουν απομονωθεί από τη μεγάλη κοιλία βοοειδών, δηλαδή από το πρώτο τμήμα του στομάχου των μηρυκαστικών. Οι μικροοργανισμοί διατηρήθηκαν σε κρυογόνα φιαλίδια των 2 mL σε θερμοκρασία  $-30 \text{ }^\circ\text{C}$  και σε μέσο

που περιείχε υγρό καλλιέργειας και γλυκερόλη σε αναλογία 1:1 v/v. Η ανανέωση των μικροοργανισμών λάμβανε χώρα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους.

#### 3.2.4. Παρασκευή εμβολίου

Για την παρασκευή του εμβολίου, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Tryptone Soya Broth, TSB, συγκέντρωσης  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , η σύσταση του οποίου φαίνεται στον πίνακα 3.5. Η επώαση διεξήχθη σε κωνικές φιάλες των 250 mL, στις οποίες προστέθηκαν 100 mL θρεπτικού μέσου και ο μικροοργανισμός, που είχε αποθηκευτεί σε κρυογόνα φιαλίδια των 2 mL, και τοποθετήθηκαν σε αναδευόμενο επωαστικό κλίβανο υπό αναερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  και ταχύτητα ανάδευσης 180 rpm για 12-16 h. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων πριν τον εμβολιασμό πραγματοποιούνταν έλεγχος της καθαρότητας της μικροβιακής καλλιέργειας μετά από δημιουργία νωπού παρασκευάσματος ή μετά από κατεργασία χρώσης κατά Gram και παρατήρησή της σε οπτικό μικροσκόπιο τύπου Zeiss (Germany).

Πίνακας 3.5: Σύνθεση του θρεπτικού υλικού Tryptone Soya Broth (TSB)

Συστατικά	Σύσταση ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	pH
Τρυπτόνη	17.00	7.3±0.2
Πεπτόνη σόγιας	3.00	
NaCl	5.00	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.50	
Δεξτρίνη	2.50	

#### 3.2.5 Θρεπτικά υποστρώματα

Ο βασικότερος παράγοντας της βελτίωσης της διαδικασίας της ζύμωσης είναι το θρεπτικό υλικό της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Για το σχεδιασμό του θρεπτικού υλικού λαμβάνονται υπόψη οι θρεπτικές και περιβαλλοντικές απαιτήσεις των μικροοργανισμών και ακόμα διάφορες οικονομικές και τεχνικές παράμετροι (κόστος, πρώτη ύλη, ανάκτηση προϊόντων, μόλυνση του περιβάλλοντος). Το

θρεπτικό υλικό περιλαμβάνει όλα τα συστατικά, τα οποία είναι απαραίτητα για την παραγωγή βιομάζας και προϊόντων και για την παροχή ενέργειας για ανάπτυξη και συντήρηση. Για την καλύτερη κατανόηση της σχέσης των συστατικών του θρεπτικού υλικού και των παραγομένων προϊόντων, βιομάζας και ενέργειας είναι απαραίτητη η στοιχειακή σύνθεση του κυττάρου των μικροοργανισμών (Stanbury *et al.*, 1995).

### 3.2.5.1. Ασυνεχής καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο το (εκχυλισμένο και μη) απόβλητο CSSL

Το απόβλητο CSSL πριν και μετά από εκχύλιση με χλωροφόρμιο και οξικό αιθυλεστέρα χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα σε ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες Duran των 500 mL. Ο ενεργός όγκος ήταν 250 mL και το απόβλητο είχε αραιωθεί δέκα φορές. Οι συγκεντρώσεις των σακχάρων ήταν οι εξής: 12,81 g·L<sup>-1</sup> ξυλόζη, 2,15 g·L<sup>-1</sup> γαλακτόζη, 1,93 g·L<sup>-1</sup> γλυκόζη, 0,74 g·L<sup>-1</sup> μαννόζη και 0,02 g·L<sup>-1</sup> αραβινόζη. Επιπλέον προστέθηκαν 5 g·L<sup>-1</sup> yeast extract ως πηγή αζώτου και ανόργανα άλατα σε συγκεντρώσεις: 1,16 g·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,31 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g·L<sup>-1</sup> NaCl, 0,2 g·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O και 0,2 g·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, όπως και μερικές σταγόνες αντιαφριστικού παράγοντα. Οι ζυμώσεις διεξήχθησαν με αυτόματη ρύθμιση του pH μέσω απλής προσθήκης MgCO<sub>3</sub> συγκέντρωσης ίδιας με τη συνολική αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (17,4 g·L<sup>-1</sup>). Τα συγκεκριμένα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με χρήση και των δύο μικροοργανισμών.

### 3.2.5.2. Ασυνεχής καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο μίγμα εμπορικών σακχάρων και διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος

Τα θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν αρχική συγκέντρωση σακχάρων ίδια με αυτή του αποβλήτου, αλλά αραιωμένου κατά δέκα φορές (17,4 g·L<sup>-1</sup>) ως εξής: 12,81 g·L<sup>-1</sup> ξυλόζη, 2,15 g·L<sup>-1</sup> γαλακτόζη, 1,93 g·L<sup>-1</sup> γλυκόζη, 0,74 g·L<sup>-1</sup> μαννόζη και 0,02 g·L<sup>-1</sup> αραβινόζη. Στο μίγμα των σακχάρων προστέθηκαν στη συνέχεια διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος κάθε φορά, 0,1 g·L<sup>-1</sup>, 0,5 g·L<sup>-1</sup>, 1 g·L<sup>-1</sup> και 2 g·L<sup>-1</sup>. Επιπλέον προστέθηκαν 5 g·L<sup>-1</sup> yeast extract και ανόργανα άλατα σε συγκεντρώσεις: 1,16 g·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,31 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g·L<sup>-1</sup> NaCl, 0,2 g·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O και 0,2 g·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, όπως και μερικές σταγόνες αντιαφριστικού παράγοντα. Προστέθηκαν 17,4 g·L<sup>-1</sup> MgCO<sub>3</sub> για ρύθμιση του pH. Τα συγκεκριμένα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με χρήση μόνο του βακτηρίου *A. succinogenes*.



### 3.2.6. Αποστείρωση και εμβολιασμός

Μετά την προετοιμασία του θρεπτικού μέσου, ακολούθησε η αποστείρωσή του και στη συνέχεια ο εμβολιασμός του. Όλα τα υλικά, σκεύη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις ζυμώσεων, αποστειρώθηκαν πριν τον εμβολιασμό σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min. Το yeast extract αποστειρώθηκε ξεχωριστά από τα υπόλοιπα συστατικά του μέσου ζύμωσης και στην συνέχεια αναμίχθηκε με αυτά υπό ασηπτικές συνθήκες, ώστε να αποφευχθεί καραμελοποίηση των σακχάρων (Krogh, 1994; Claude & Ubbink, 2006). Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε, επίσης, υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.

### 3.2.7. Συνθήκες ζύμωσης διαλείποντος έργου

Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες Duran των 500 mL, με ενεργό όγκο 250 mL και όγκο εμβολίου 10% v/v. Οι συνθήκες που επικράτησαν ήταν αναερόβιες με συνεχή παροχή CO<sub>2</sub> 0,5 vvm, αναδευόμενες με ρυθμό 180 rpm και σε θερμοκρασία 37 °C.

### 3.2.8. Αναλυτικές μέθοδοι

#### 3.2.8.1. *Προσδιορισμός και μέτρηση του pH*

Το pH του διαλύματος της καλλιέργειας μετρούνταν καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης με πεχάμετρο τύπου Jenway 3020 pH meter.

#### 3.2.8.2. *Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας*

Ο προσδιορισμός της βιομάζας έγινε έμμεσα με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, O.D.). Κατά τη διάρκεια όλων των ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν λαμβανόταν δείγμα από το υγρό της καλλιέργειας (2 mL) και η βιομάζα διαχωριζόταν με φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22 (9000 rpm, 10 min στους 7 °C). Χρησιμοποιήθηκαν 200 mL από το υγρό της καλλιέργειας (δείγμα πριν τη φυγοκέντρηση) στα οποία προστέθηκε HCl 7% w/w σε αναλογία 1:20 v/v με σκοπό την εξουδετέρωση του MgCO<sub>3</sub> (Becker *et*

al., 2013). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λήψη της τιμής της απορρόφησης του δείγματος σε μήκος κύματος 660 nm, σε φασματοφωτόμετρο. Το διάλυμα αναφοράς παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας 200 mL από το υπερκείμενο υγρό. Η τιμή που λήφθηκε από την πρώτη δειγματοληψία αποτέλεσε το μηδενικό σημείο για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης του μικροοργανισμού και τα δείγματα που ακολούθησαν συγκρίνονταν με βάση την εν λόγω τιμή.

Επιπλέον, κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *A. succinogenes* σε μίγμα καθαρών σακχάρων λαμβανόταν δείγμα και η βιομάζα διαχωριζόταν με φυγοκέντρηση. Μετά την αποθήκευση του υπερκείμενου υγρού, ακολούθησε προσθήκη HCl 7% w/w και ομογενοποίηση με τη βιομάζα με σκοπό την εξουδετέρωση του MgCO<sub>3</sub>. Στη συνέχεια, έγινε φυγοκέντρηση της βιομάζας ξανά και το υπερκείμενο υγρό απορριπτόταν. Τέλος, τοποθετήθηκαν τα φιαλίδια σε φούρνο προς ξήρανση (90±5 °C) μέχρι σταθερού βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίσθηκε σε ζυγό ακριβείας τύπου Sartorius basic, εκφρασμένο σε g·L<sup>-1</sup>. Δεν κατέστη δυνατή η συσχέτιση της τιμής της οπτικής πυκνότητας και της τιμής του ξηρού βάρους, διότι τα αποτελέσματα από τις ζυμώσεις σε καθαρά σάκχαρα δεν ήταν αντιπροσωπευτικά για να παρουσιαστούν στην παρούσα μελέτη.

### 3.2.8.3. Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των καταναλωθέντων σακχάρων και των παραγόμενων οξέων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης, HPLC. Όλα τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των σακχάρων και των παραγόμενων οξέων αφού πρώτα αραιώθηκε με 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και φιλτραρίστηκε με τη χρήση φίλτρων whatman που διέθεταν μεμβράνη με πόρους διαμέτρου 0,2 μm.

Τα χαρακτηριστικά του υγρού χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- Υγρός Χρωματογράφος Υψηλής Απόδοσης: Waters 600E
- Στήλη (στατική φάση): Aminex HPX-87H (Bio-rad, Richmond, USA)(300 mm x 7,8 mm)
- Κινητή φάση: 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε απιονισμένο, απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό.
- Ανιχνευτής: RI (410 Waters)
- Ροή κινητής φάσης: 0,6 mL·min<sup>-1</sup>
- Όγκος ένεσης: 20μL

## 4. Αποτελέσματα και συζήτηση

### 4.1. Εισαγωγή

Στην παρούσα μελέτη ποσότητα φαινολικών συστατικών διαχωρίστηκε με εκχύλιση από το απόβλητο χαρτοβιομηχανίας Concentrated Spent Sulphite Liquor (CSSL) με σκοπό να χρησιμοποιηθεί αυτό το απόβλητο ως θρεπτικό υπόστρωμα για μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Το CSSL εκχυλίστηκε με πέντε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες, εύκολα ανακτήσιμους με εξάτμιση υπό κενό με σκοπό να διαχωριστούν τα φαινολικά συστατικά. Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η ποσότητα των ολικών φαινολικών από τα εκχυλίσματα με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002) και η αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH• (Scherer & Godoy, 2009) και ταυτοποιήθηκε κάθε φαινολική ένωση με HPLC.

Πραγματοποιήθηκε σειρά μικροβιακών ζυμώσεων με σκοπό την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Αρχικά, παράχθηκε ηλεκτρικό οξύ με τη χρήση των βακτηρίων *Actinobacillus succinogenes* και *Basfia succiniciproducens* με θρεπτικό μέσο το απόβλητο CSSL και μετά ακολούθησαν ζυμώσεις με το προεπεξεργασμένο CSSL (χωρίς φαινολικά συστατικά) απόβλητο. Χρησιμοποιήθηκε το εκχυλισμένο CSSL με δύο από τους πέντε οργανικούς διαλύτες που δοκιμάστηκαν. Με αυτούς τους διαλύτες η ανάκτηση των φαινολικών συστατικών ήταν η υψηλότερη. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με το βακτήριο *A. succinogenes* σε μίγμα καθαρών σακχάρων. Για να μελετηθεί η παρεμποδιστική δράση από φαινολικές ενώσεις προστέθηκε γαλλικό οξύ σε διάφορες συγκεντρώσεις.

### 4.2. Διαχωρισμός και ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών συστατικών

#### 4.2.1. Επιλογή του κατάλληλου οργανικού διαλύτη για την εκχύλιση

Ο καθοριστικός παράγοντας στη διαδικασία της εκχύλισης είναι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης (Routray & Orsat, 2013). Ένας κατάλληλος διαλύτης θα πρέπει να διαλύει, αν είναι δυνατόν εκλεκτικά την οργανική ουσία που πρόκειται να εκχυλιστεί και να μην αντιδρά με αυτήν. Επίσης, να έχει αρκετά διαφορετική πυκνότητα από την άλλη φάση της εκχύλισης, ώστε να διαχωρίζεται εύκολα, και να μην αναμιγνύεται ή να σχηματίζει σταθερό γαλάκτωμα με την άλλη φάση. Επιπλέον,

να έχει χαμηλό σημείο ζέσεως ώστε να απομονώνεται εύκολα η ουσία στο τέλος με εξάτμιση και να μην είναι εύφλεκτος ή τοξικός. Σημαντικό ζήτημα για οικονομικούς λόγους είναι το κόστος του διαλύτη να μην είναι υψηλό. (Βαμβακάκη, 2003; Κουμπής κ.ά., 2012).

Πίνακας 4.1: Χαρακτηριστικά οργανικών διαλυτών και προδιαγραφές βάσει του Προτύπου NFPA 704

Διαλύτης	Κατηγορία	Σημείο ζέσεως °C	Πυκνότητα g·cm <sup>-3</sup>	Προδιαγραφές βάσει του Προτύπου NFPA 704
Οξικός αιθυλεστέρας	Εστέρας	77,1	0,897	1. Έντονη ή συνεχιζόμενη αλλά όχι χρόνια έκθεση μπορεί να προκαλέσει προσωρινή αδιαθεσία ή πιθανή υπολειμματική βλάβη. 2. Εξατμίζεται γρήγορα σε κανονική θερμοκρασία και ατμοσφαιρική πίεση ή διασκορπίζεται εύκολα στον αέρα και καίγεται εύκολα (σημείο ανάφλεξης <23 °C). 3. Φυσιολογικά σταθερό, ακόμα και κάτω από έκθεσης σε φωτιά. Δεν αντιδρά με το νερό.
Χλωροφόρμιο	Αλειφατικός αλογονωμένος υδρογονάνθρακας	61,2	1,480	1. Έντονη ή συνεχιζόμενη αλλά όχι χρόνια έκθεση μπορεί να προκαλέσει προσωρινή αδιαθεσία ή πιθανή υπολειμματική βλάβη. 2. Δεν καίγεται. 3. Φυσιολογικά σταθερό, ακόμα και κάτω από έκθεσης σε φωτιά. Δεν αντιδρά με το νερό.
Διαιθυλαιθέρας	Αιθέρας	34,6	0,713	1. Έντονη ή συνεχιζόμενη αλλά όχι χρόνια έκθεση μπορεί να προκαλέσει προσωρινή αδιαθεσία ή πιθανή υπολειμματική βλάβη. 2. Εξατμίζεται γρήγορα σε κανονική θερμοκρασία και ατμοσφαιρική πίεση ή διασκορπίζεται εύκολα στον αέρα και καίγεται εύκολα (σημείο ανάφλεξης <23 °C). 3. Φυσιολογικά σταθερό, αλλά μπορεί να γίνει ασταθές σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις.
Τρι-χλωροαιθυλένιο	Αλειφατικός αλογονωμένος υδρογονάνθρακας	87,2	1,460	1. Έντονη ή συνεχιζόμενη αλλά όχι χρόνια έκθεση μπορεί να προκαλέσει προσωρινή αδιαθεσία ή πιθανή υπολειμματική βλάβη. 2. Πρέπει να θερμανθεί πριν προκληθεί ανάφλεξη. σημείο ανάφλεξης >93 °C. 3. Φυσιολογικά σταθερό, ακόμα και κάτω από έκθεσης σε φωτιά. Δεν αντιδρά με το νερό.
Βενζόλιο	Αρωματικός υδρογονάνθρακας	80,1	0,877	1. Έντονη ή συνεχιζόμενη αλλά όχι χρόνια έκθεση μπορεί να προκαλέσει προσωρινή αδιαθεσία ή πιθανή υπολειμματική βλάβη. 2. Υγρά και στερεά που μπορούν να αναφλεγούν κάτω από σχεδόν όλες τις θερμοκρασιακές καταστάσεις. Τα υγρά έχουν σημείο ανάφλεξης <23 °C και σημείο βρασμού ≥38 °C ή έχουν σημείο ανάφλεξης μεταξύ 23 °C και 38 °C. 3. Φυσιολογικά σταθερό, ακόμα και κάτω από έκθεσης σε φωτιά. Δεν αντιδρά με το νερό.

Για το διαχωρισμό φαινολικών συστατικών έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διάφοροι οργανικοί διαλύτες. Οι Frazer και McCaskey (1989), πραγματοποίησαν εκχυλίσεις σε όξινα υδρολύματα «σκκληρής ξυλείας» με οξικό αιθυλεστέρα, τριχλωροαιθυλένιο, βενζόλιο, χλωροφόρμιο και εξάνιο. Στη συνέχεια, οι Parajó *et al.* (1997), πραγματοποίησαν εκχυλίσεις σε όξινα υδρολύματα του πλατύφυλλου και αιθαλούς δέντρου *Eucalyptus globulus*, επίσης, με οξικό αιθυλεστέρα, τριχλωροαιθυλένιο, χλωροφόρμιο και εξάνιο, αλλά και με διαιθυλαιθέρα. Οι Cruz *et al.* (1999), Cruz *et al.* (2005) και οι Parajó *et al.* (2008) πραγματοποίησαν εκχυλίσεις σε όξινα υδρολύματα του *E. globulus* με οξικό αιθυλεστέρα. Τέλος, οι Faustino *et al.* (2010), πραγματοποίησαν εκχυλίσεις σε όξινα υδρολύματα του αποβλήτου CSSL επίσης με οξικό αιθυλεστέρα. Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη με μερικές από τις χαρακτηριστικές τους ιδιότητες και τις προδιαγραφές τους βάσει του προτύπου NFPA 704, (National Fire Protection Association, 2012).

Όλες οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου αποφεύγοντας τη θέρμανση ή ψύξη για να μην χαρακτηριστεί η διαδικασία περισσότερο δαπανηρή. Ο χρόνος ανάμιξης και αποκατάστασης της ισορροπίας ήταν 30 λεπτά και 15 λεπτά, αντίστοιχα. Έχει μελετηθεί από τους Cruz *et al.* (1999), ότι σε προϊόντα όξινης υδρόλυσης του *E. globulus* ο χρόνος επαφής 30 λεπτών θεωρείται αρκετός για να επιτευχθεί η εκχύλιση. Παρατηρήθηκε ότι ο διαχωρισμός υδατικής και οργανικής φάσης πραγματοποιήθηκε σχεδόν αμέσως όταν χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες ο οξικός αιθυλεστέρας, το χλωροφόρμιο και ο διαιθυλαιθέρας. Στην περίπτωση του τριχλωροαιθυλενίου και του βενζολίου με έντονη ανάδευση σχηματίστηκε γαλάκτωμα με υψηλή τιμή ιξώδους. Χρειάστηκε η ανάδευση να πραγματοποιηθεί με πιο ήπιο τρόπο και επιτεύχθηκε τελικά διαχωρισμός φάσεων.

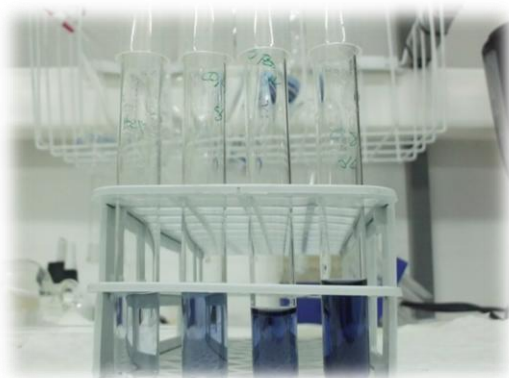


Εικόνα 4.1: Εκχύλιση του αποβλήτου CSSL με διαιθυλαιθέρα (αριστερά) και με χλωροφόρμιο (δεξιά)

Το αραιωμένο 1:10 απόβλητο CSSL αποτελεί την υδατική φάση και οι προαναφερθέντες διαλύτες την οργανική φάση. Επειδή τα υγρά είναι μη αναμίξιμα μεταξύ τους σχηματίζουν δύο στιβάδες με το πυκνότερο υγρό να αποτελεί την κάτω στιβάδα. Αναμενόμενο ήταν, λοιπόν, στις περιπτώσεις του οξικού αιθυλεστέρα, του διαιθυλαιθέρα και του βενζολίου, όπου η πυκνότητα αυτών των διαλυτών είναι μικρότερη από ότι είναι αυτή του ύδατος ( $0,997 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ), η οργανική φάση να βρίσκεται πάνω από την υδατική. Αντιθέτως, όταν χρησιμοποιήθηκε χλωροφόρμιο και τριχλωροαιθυλένιο, η οργανική φάση με πυκνότητα μεγαλύτερη από αυτή του ύδατος βρισκόταν κάτω από την υδατική. Στην εικόνα 4.1 φαίνεται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων όταν χρησιμοποιείται ως διαλύτης ο διαιθυλαιθέρας (αριστερά) και το χλωροφόρμιο (δεξιά).

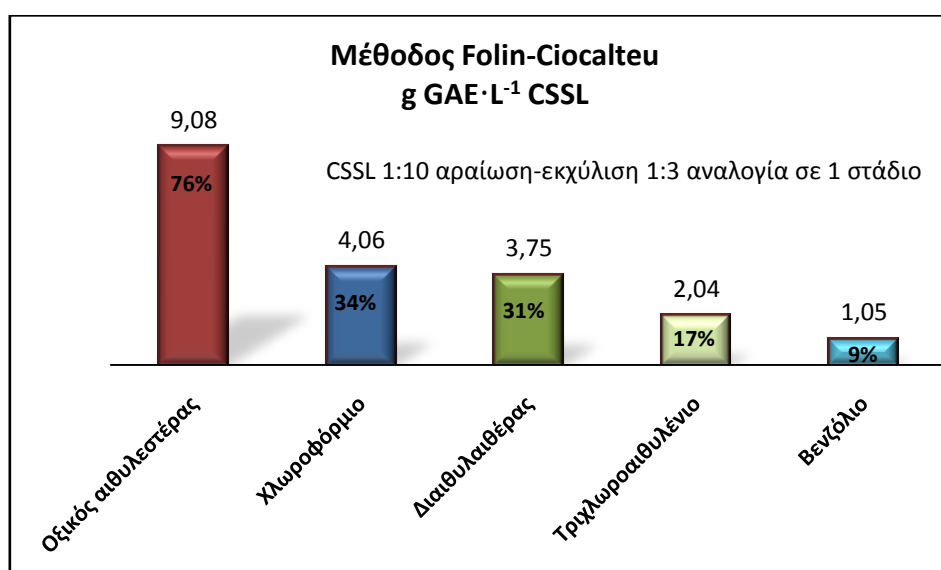
#### 4.2.2. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών (μέθοδος Folin-Ciocalteu)

Κατά την πειραματική διαδικασία προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu τα ολικά φαινολικά συστατικά για τα διάφορα εκχυλίσματα που προέκυψαν ύστερα από εκχύλιση με πέντε διαφορετικούς διαλύτες (οξικό αιθυλεστέρα, χλωροφόρμιο, διαιθυλαιθέρα, τριχλωροαιθυλένιο και βενζόλιο). Η αναλογία όγκου αραιωμένου 1:10 CSSL προς τον χρησιμοποιούμενο κάθε φορά διαλύτη ήταν 1:3 v/v. Επίσης, προσδιορίστηκαν το σύνολο των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων που προέκυψαν ύστερα από εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα σε δύο και σε τρία στάδια για τις αναλογίες όγκου αραιωμένου 1:10 CSSL προς οξικό αιθυλεστέρα 1:3 v/v και 1:2 v/v.



*Εικόνα 4.2: Οξειδοαναγωγική αντίδραση φαινολικών ενώσεων με το αντίδραστήριο Folin-Ciocalteu σε αλκαλικές συνθήκες (διαβάθμιση χρώματος)*

Προετοιμάστηκαν τα δείγματα και μετρήθηκε η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 765 nm (εικόνα 4.2). Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα δύο φορές. Ακολούθησε υπολογισμός των συγκεντρώσεων των συνολικών φαινολικών συστατικών του δείγματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος σε  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  δείγματος ( $\text{g GAE}\cdot\text{L}^{-1}$ ) με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης με εξίσωση  $y = 0,941x - 0,017$  του γραφήματος 3.1. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναγωγή των τιμών για το πυκνό απόβλητο CSSL το οποίο είχε υποστεί αραίωση 1:10. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα επόμενα γραφήματα 4.1 και 4.2.

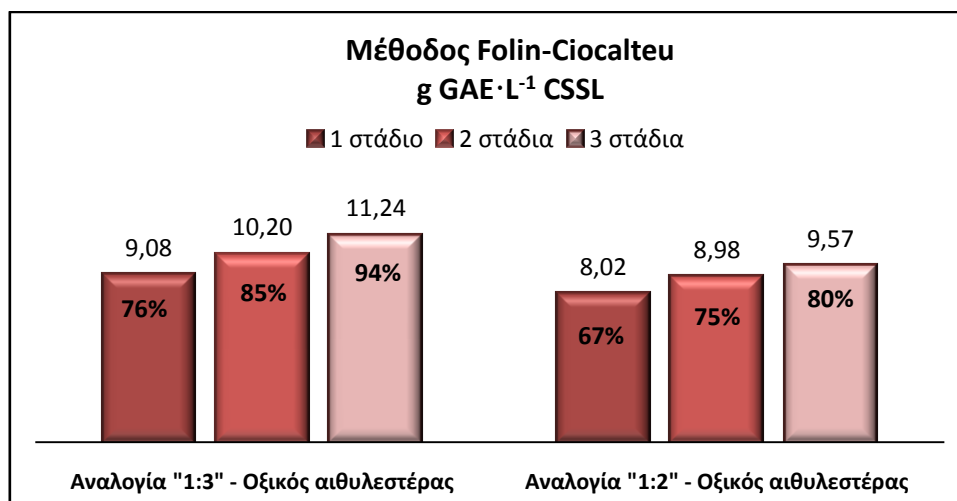


Γράφημα 4.1: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών σε  $\text{g GAE}\cdot\text{L}^{-1}$  CSSL που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu από τα πέντε διαφορετικά εκχυλίσματα

Στην απλή περίπτωση της εκχύλισης με τους πέντε διαφορετικούς διαλύτες σε αναλογία όγκου 1:3 v/v σε ένα στάδιο φαίνεται από το γράφημα 4.1 πως ο οξικός αιθυλεστέρας είναι ο πιο αποτελεσματικός οργανικός διαλύτης για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Με τη χρήση του οξικού αιθυλεστέρα ανακτάται το 76% των φαινολικών συστατικών ενώ με το χλωροφόρμιο και τον διαιθυλαιθέρα το 34% και το 31%, αντίστοιχα. Οι τελευταίοι δύο διαλύτες, το τριχλωροαιθυλένιο και το βενζόλιο εκχυλίζουν πολύ μικρό ποσοστό φαινολικών ενώσεων, 17% και 9%, αντίστοιχα. Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν βάσει της συνολικής συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων η οποία είχε υπολογιστεί με το πρότυπο EN 16109 ίση με  $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της αναλογίας όγκου αποβλήτου προς οργανικό διαλύτη καθώς και η επίδραση περισσοτέρων του ενός σταδίου εκχύλισης.

Η εκχύλιση σε ένα στάδιο με αναλογία όγκου 1:3 v/v CSSL προς οξικό αιθυλεστέρα έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από ότι η 1:2 v/v (γράφημα 4.2). Οι Cruz *et al.* (1999), επίσης, δοκίμασαν διαφορετικές αναλογίες όγκου υδρολύματος *E. globulus* προς οξικό αιθυλεστέρα από 1:1 v/v μέχρι 1:9 v/v και συμπέραναν πως χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη αναλογία όγκου από 1:3 v/v το ποσοστό ανάκτησης φαινολικών συστατικών δεν άλλαζε σημαντικά.



Γράφημα 4.2: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών σε g GAE·L<sup>-1</sup> CSSL που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu από τα διαφορετικά εκχυλίσματα

Με μια απλή εκχύλιση σε ένα στάδιο, όμως, δεν μπορεί όλη η ποσότητα των φαινολικών ουσιών να μεταφερθεί στον οργανικό διαλύτη. Απαιτούνται αρκετά στάδια εκχυλίσεων για να ανακτηθούν όλα τα φαινολικά συστατικά από το απόβλητο (Lloyd, 2004). Στην περίπτωση όπου η αναλογία όγκου ήταν 1:3 v/v μετά από εκχύλιση τριών σταδίων το ποσοστό ανάκτησης των φαινολικών ενώσεων από 76% για την απλή εκχύλιση ενός σταδίου αυξήθηκε σε 94%, που σημαίνει πως ανακτήθηκε σχεδόν όλη η ποσότητα των φαινολικών συστατικών. Στην περίπτωση όπου η αναλογία όγκου ήταν 1:2 v/v παρατηρήθηκαν πιο μικρά ποσοστά. Μετά από τρεις εκχυλίσεις ανακτήθηκε το 80%, ενώ με μία εκχύλιση είχε εκχυλιστεί μόνο το 67%.

Ουσιαστικά, όμως, η ποσότητα των φαινολικών που ανακτώνται σε δύο και σε τρία στάδια δεν είναι τόσο σημαντική (1-2 g GAE·L<sup>-1</sup> CSSL παραπάνω) ώστε να δικαιολογεί το κόστος του οργανικού διαλύτη. Το κόστος του οξικού αιθυλεστέρα είναι μεγάλο, και έτσι τα επόμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το επεξεργασμένο απόβλητο CSSL με απλή εκχύλιση ενός σταδίου και με αναλογία όγκου αποβλήτου προς διαλύτη 1:3 v/v.

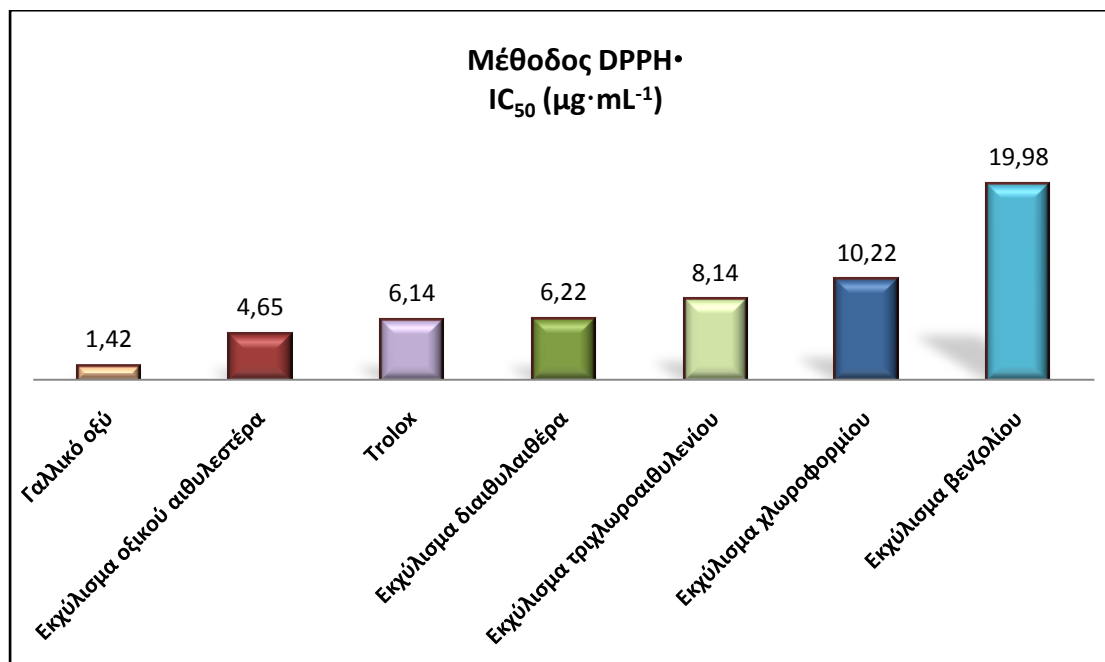


#### 4.2.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (μέθοδος DPPH•)

Για να μελετηθεί όχι μόνο η απόδοση της εκχύλισης των φαινολικών συστατικών, αλλά και η ποιότητά τους (αντιοξειδωτική ικανότητα) υπολογίστηκε η τιμή  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) και ο δείκτης αντιοξειδωτική δραστηριότητας (AAI) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DPPH•. Προετοιμάστηκαν τα δείγματα και μετρήθηκε η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 517 nm (εικόνα 4.3).

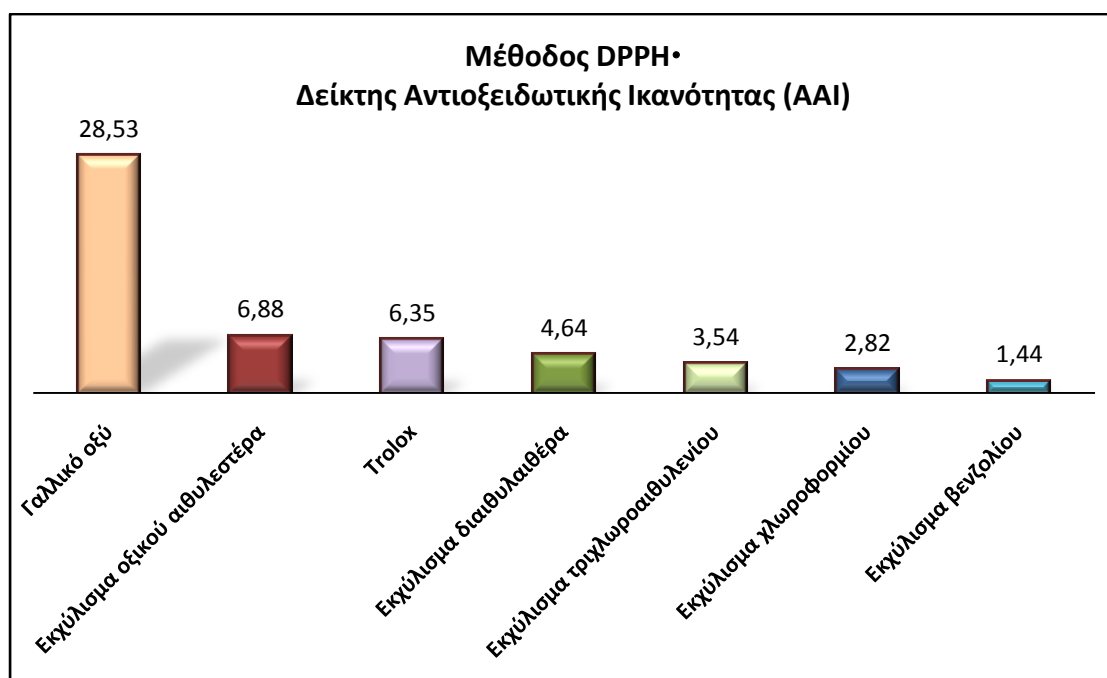


Εικόνα 4.3: Αντίδραση φαινολικών ενώσεων με την DPPH• ρίζα (διαβάθμιση χρώματος)



Γράφημα 4.3: Οι τιμές  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) για τα εκχυλίσματα από τους πέντε διαφορετικούς διαλύτες για δύο πρότυπες καθαρές φαινολικές ενώσεις, το γαλλικό οξύ και το trolox

Στο *γράφημα 4.3* παρουσιάζονται οι τιμές  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) για τα εκχυλίσματα από τους πέντε διαφορετικούς διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν και για δύο πρότυπες καθαρές φαινολικές ενώσεις, το γαλλικό οξύ και το trolox (2,5,7,8-τετραμεθυλο-6-υδροξυ-χρωμαιο-2-καρβοξυλικό οξύ). Ενώ, στο *γράφημα 4.4* φαίνονται οι δείκτες (AAI) των εκχυλισμάτων για τις ίδιες ενώσεις.

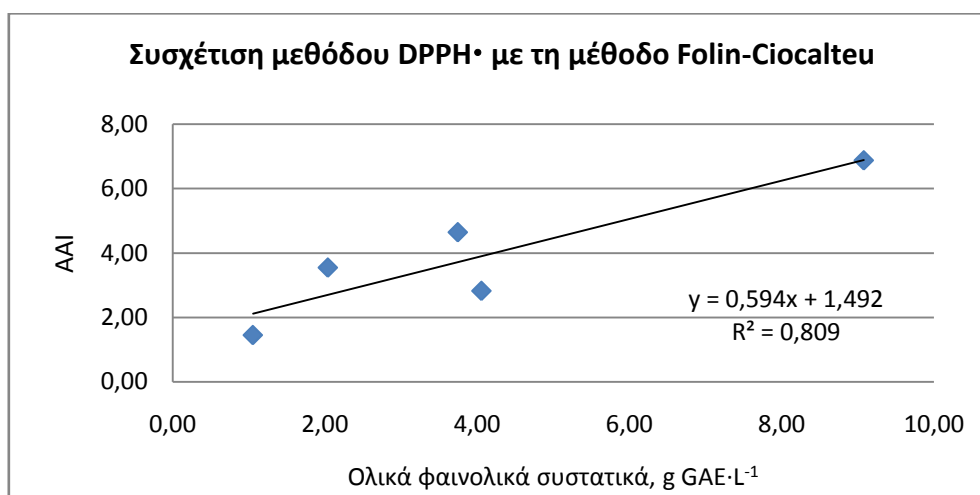


*Γράφημα 4.4:* Οι τιμές AAI για τα εκχυλίσματα από τους πέντε διαφορετικούς διαλύτες για δύο πρότυπες καθαρές φαινολικές ενώσεις, το γαλλικό οξύ και το trolox

Χαμηλές τιμές  $IC_{50}$  και υψηλές τιμές AAI, αντίστοιχα για την κάθε ουσία, είναι δείκτες της ισχυρής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Τα φυτικά εκχυλίσματα έχουν πολύ μικρή αντιοξειδωτική ικανότητα όταν  $AAI < 0,5$ , μέτρια αντιοξειδωτική ικανότητα όταν ο AAI έχει τιμή μεταξύ 0,5 και 1, ισχυρή αντιοξειδωτική δράση όταν ο AAI έχει τιμή μεταξύ 1 και 2, και πολύ ισχυρή όταν  $AAI > 2$  (Scherer & Godoy, 2009). Η σύγκριση με δύο πρότυπες καθαρές ενώσεις, ένα πάρα πολύ ισχυρό φαινολικό οξύ, όπως είναι το γαλλικό οξύ, και το trolox, μια συνθετική αντιοξειδωτική ουσία, παράγωγο της βιταμίνης E, διευκολύνουν την κατανόηση των διαφορών στην αντιοξειδωτική ικανότητα των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών. Η συγκέντρωση της DPPH• που χρησιμοποιήθηκε ήταν  $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση των τιμών  $IC_{50}$  μεταξύ των διαφορετικών εκχυλισμάτων και των προτύπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος και trolox.

Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα έχει τη χαμηλότερη τιμή  $IC_{50}$  ( $4,65 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα (γράφημα 4.3), καθώς και την υψηλότερη τιμή AAI (6,88) μεταξύ των τιμών AAI στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί διαλύτες για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών (γράφημα 4.4). Η μεγάλη διαφορά με το γαλλικό οξύ είναι εμφανής μιας και αυτό το φαινολικό οξύ έχει  $IC_{50}$   $1,42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  και AAI 28,53, ενώ με το trolox ( $IC_{50}$   $6,14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  και AAI 6,35) οι τιμές είναι αρκετά κοντινές, κυρίως για τον δείκτη AAI, αποδεικνύοντας πόσο ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα έχουν τα φαινολικά συστατικά του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα. Τα εκχυλίσματα από όλους τους διαλύτες, εκτός από αυτό του βενζολίου, χαρακτηρίζονται από πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δραστηριότητα αφού  $AAI > 2$ . Ακόμα, εκχυλίζοντας το αραιωμένο 1:10 απόβλητο CSSL με βενζόλιο, τα περιεχόμενα φαινολικά συστατικά έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δραστηριότητα αφού ο AAI έχει τιμή μεταξύ 1 και 2. Συμπερασματικά, τα εκχυλίσματα από όλους τους διαλύτες γενικά δείχνουν να έχουν πολύ καλή αντιοξειδωτική ικανότητα.

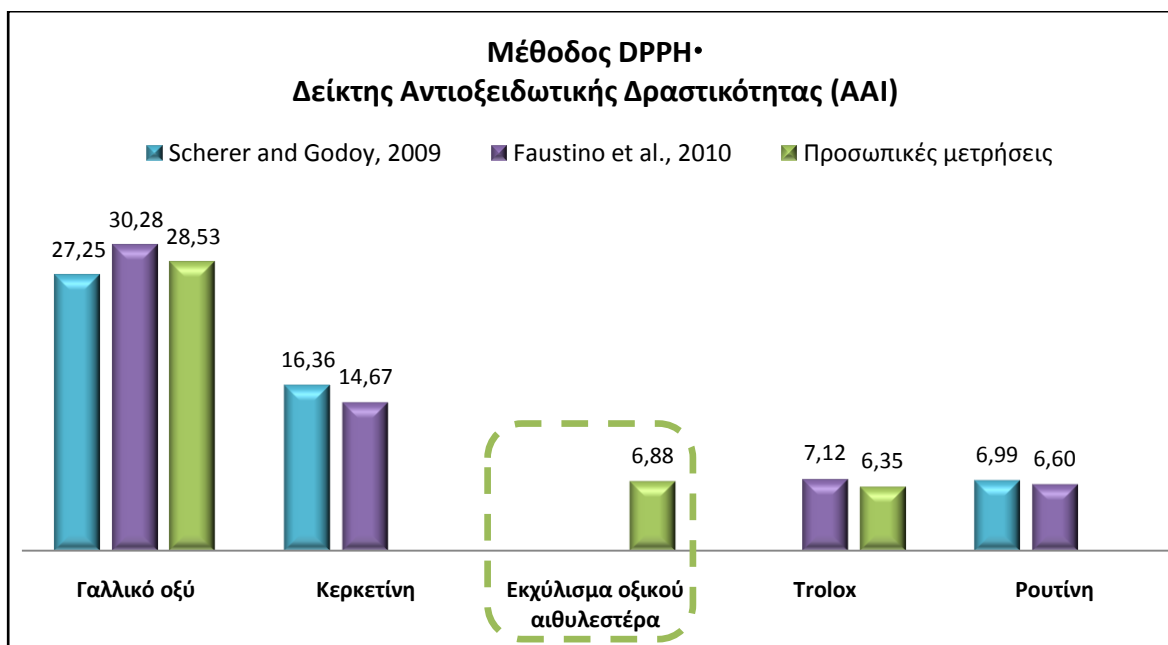
Σύμφωνα με βιβλιογραφικές μελέτες (Aksoy *et al.*, 2013; Karamac' *et al.*, 2012; Li *et al.* 2009; Roginsky & Lissi, 2005) η μέθοδος εκτίμησης του ολικού φαινολικού περιεχομένου με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και ο προσδιορισμός του δείκτη αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (AAI) των φαινολικών συστατικών χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο DPPH• παρουσιάζουν μετρήσεις συγκρίσιμες. Σε γενικές γραμμές παρατηρείται πως τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με τη μέθοδο DPPH• συσχετίζονται με τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu, αν και φαίνεται πως το εκχύλισμα του χλωροφορμίου δεν είχε την τιμή AAI που ήταν αναμενόμενη, δηλαδή μεταξύ των εκχυλισμάτων του οξικού αιθυλεστέρα και του διαιθυλαιθέρα.



Γράφημα 4.5: Συσχέτιση αποτελεσμάτων της μεθόδου Folin-Ciocalteu με τη μέθοδο DPPH•

Στο γράφημα 4.5 παρουσιάζεται η συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δύο αυτών μεθόδων, όπου ο συντελεστής προσδιορισμού έχει τιμή  $R^2=0,809$  και άρα ο συντελεστής συσχέτισης θα είναι  $R=0,899$ . Αυτή η τιμή θεωρείται υψηλή για να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων είναι αρκετά καλή (Li *et al.* 2009).

Από τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων των μεθόδων DPPH• και Folin-Ciocalteu προκύπτει το γενικό συμπέρασμα πως η ποσότητα των φαινολικών συστατικών που εκχυλίστηκε από το CSSL με τον κάθε διαλύτη αντιπροσωπεύει φαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα όμως, στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το χλωροφόρμιο, η πιο πιθανή εξήγηση της χαμηλής τιμής του δείκτη AAI είναι πως το περιεχόμενο των φαινολικών συστατικών που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu δεν αντιστοιχεί μόνο σε φαινολικές ενώσεις αλλά και σε άλλες ουσίες μη φαινολικής φύσεως χωρίς αντιοξειδωτική ικανότητα. Όσον αφορά τον οξικό αιθυλεστέρα τα αποτελέσματα των δύο αυτών μεθόδων συμφωνούν και άρα εκτός από το γεγονός ότι η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που εκχυλίστηκαν ήταν η μεγαλύτερη, συγκριτικά με τα εκχυλίσματα από τους υπόλοιπους διαλύτες, είχαν επίσης τα φαινολικά αυτά συστατικά και την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.



Γράφημα 4.6: Βιβλιογραφική αναφορά και σύγκριση των τιμών AAI

Στο γράφημα 4.6 γίνεται βιβλιογραφική αναφορά στους Scherer και Godoy (2009) και στους Faustino *et al.* (2010) και σύγκριση των δεικτών αντιοξειδωτικής

δραστηριότητας για το γαλλικό οξύ, την κερκετίνη, το trolox και την ρουτίνη. Και τα τέσσερα αυτά φαινολικά συστατικά χαρακτηρίζονται από πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δραστηριότητα αφού  $AAI > 2$ . Μετρήθηκε η τιμή του δείκτη AAI του γαλλικού οξέος και βρέθηκε ίση με 28,53, παρόμοια με τις τιμές που υπολογίστηκε από τους Scherer και Godoy (2009), 27,25, και από τους Faustino *et al.* (2010), 30,28. Ομοίως, μετρήθηκε η τιμή του δείκτη AAI του trolox και βρέθηκε ίση με 6,35, παρόμοια με την τιμή που υπολογίστηκε από τους Faustino *et al.* (2010), 7,12. Τέλος, οι τιμές των δύο φλαβονοειδών, της κερκετίνης και της ρουτίνης, που έχουν προσδιοριστεί από αυτούς τους ερευνητές, είναι παραπλήσιες και άρα αποδεικνύεται πως ο δείκτης AAI είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση της DPPH•.

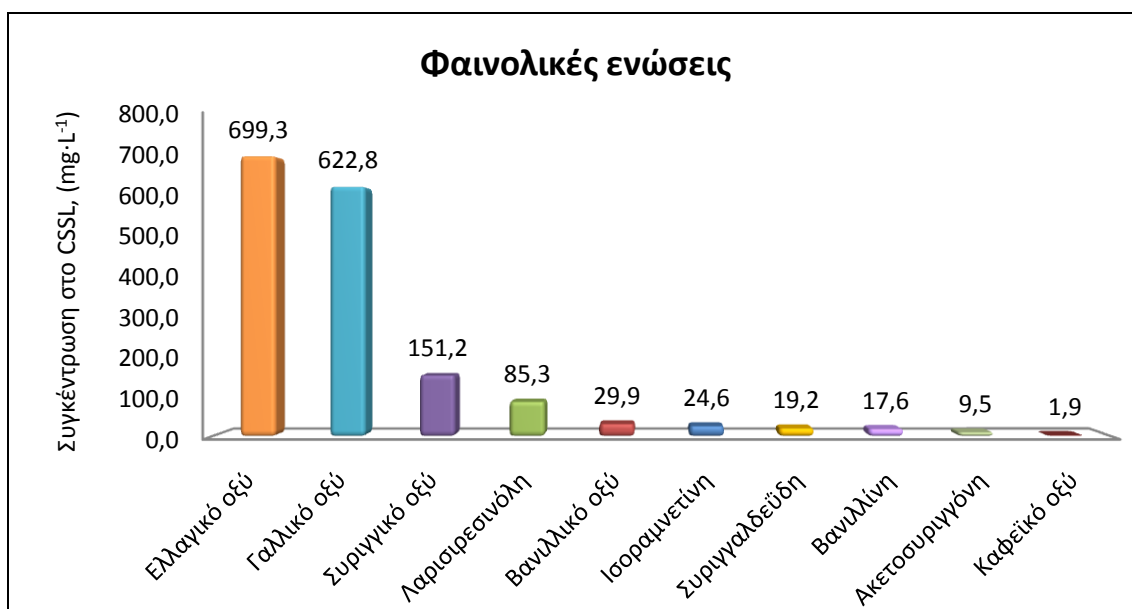
Συμπερασματικά, το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα φαίνεται να κατέχει μια πολύ καλή θέση ανάμεσα στις τιμές των προαναφερθέντων ισχυρών αντιοξειδωτικών ουσιών. Η τιμή του δείκτη AAI είναι παραπλήσια με αυτή του trolox και της ρουτίνης.

#### 4.2.4. Ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών με HPLC-DAD

Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα εξετάστηκε στη συνέχεια για να ταυτοποιηθούν οι φαινολικές ενώσεις που περιέχει. Από τις είκοσι επτά φαινολικές πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, ύστερα από βιβλιογραφική ανασκόπηση, ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της HPLC δέκα από αυτές (γράφημα 4.7). Για την ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκαν φαινολικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί από ερευνητές σε εκχύλισμα αποβλήτου της βιομηχανίας χάρτου και χαρτοπολτού ύστερα από θειώδη πολυποίηση (Ashorn και Enkvist, 1962; Faustino *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2009), αλλά και φαινολικές ενώσεις από εκχύλισμα όξινης υδρόλυσης του *E. globulus* (Conde *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 2005; Garrote *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012; Vázquez *et al.*, 2008).

Το ελλαγιτικό και το γαλλικό οξύ υπάρχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο απόβλητο CSSL σε σχέση με τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν, και συγκεκριμένα  $699,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  και  $622,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , αντίστοιχα. Το ελλαγιτικό οξύ είναι το διμερές παράγωγο του γαλλικού οξέος όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, ενώ όταν βρίσκεται δεσμευμένο είναι συνήθως ενωμένο με εστερικό δεσμό με γλυκόζη και δημιουργούνται έτσι οι ελλαγιτανίνες, υδρολυόμενες ταννίνες (Ventura *et al.*, 2008; Vermerris & Nicholson, 2008). Ελλαγιτανίνες έχουν βρεθεί σε εκχύλισμα όξινης υδρόλυσης του *E. globulus* (Cruz *et al.*, 2005). Από την άλλη το γαλλικό οξύ είναι ένα φαινολικό οξύ (Vermerris & Nicholson, 2008), το τριυδροξυλιωμένο παράγωγο του βενζοϊκού οξέος, το οποίο έχει μελετηθεί από τους Marques *et al.*, 2009, ότι αποτελεί το κύριο φαινολικό συστατικό του CSSL. Οι ίδιοι ερευνητές έχουν

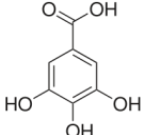
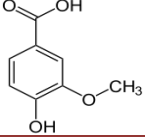
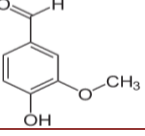
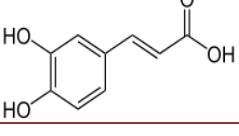
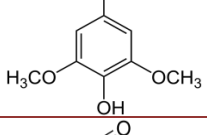
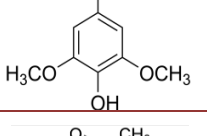
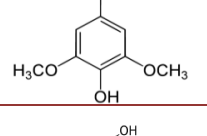
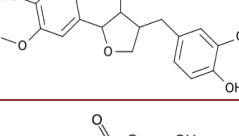
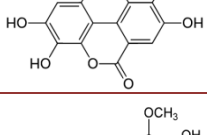
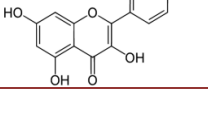
ταυτοποιήσει και το ελλαγικό οξύ αλλά σε πολύ μικρότερη ποσότητα από αυτή του γαλλικού οξέος. Και τα δύο αυτά οξέα έχουν βρεθεί σε μεγάλες ποσότητες και στο ξύλο του *E. globulus* (Conde *et al.*, 1996; Freire *et al.*, 2002).



Γράφημα 4.7: Κύριες φαινολικές ενώσεις που εντοπίστηκαν στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα (mg φαινολικών ενώσεων·L<sup>-1</sup> CSSL)

Στη συνέχεια, οι τιμές των συγκεντρώσεων του συριγγικού οξέος και της λαρισιρεσινόλης ήταν 151,2 mg·L<sup>-1</sup> και 85,3 mg·L<sup>-1</sup>, αντίστοιχα. Ενώ, χαμηλότερες συγκεντρώσεις είχαν το βανιλικό οξύ (29,9 mg·L<sup>-1</sup>), η ισοραμνετίνη (24,6 mg·L<sup>-1</sup>), η συριγγαλδεΰδη (19,2 mg·L<sup>-1</sup>) και η βανιλίνη (17,6 mg·L<sup>-1</sup>). Τέλος, η ακετοσυριγγόνη και το καφεϊκό οξύ είχαν πολύ μικρές συγκεντρώσεις, 9,5 mg·L<sup>-1</sup> και 1,9 mg·L<sup>-1</sup>, αντίστοιχα. Από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί, επίσης, πως στο CSSL περιέχονται το συριγγικό οξύ (Marques *et al.*, 2009, Faustino *et al.*, 2010), το βανιλικό οξύ (Ashorn και Enkvist, 1962, Marques *et al.*, 2009), η συριγγαλδεΰδη (Faustino *et al.*, 2010), η βανιλίνη (Ashorn και Enkvist, 1962) και η ακετοσυριγγόνη (Faustino *et al.*, 2010).

Πίνακας 4.2: Τα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηριστικά αυτών

Φαινολική ουσία	Μήκος κύματος (nm)	Χρόνος έκλυσης (min)	Χημικός τύπος	Συντακτικός τύπος	Κατηγορία φαινολικών συστατικών
Γαλλικό οξύ	280	5,465	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>		Φαινολικό οξύ (παράγωγο του υδροξυβενζοϊκού οξέος)
Βανιλικό οξύ	254	16,927	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>		Φαινολικό οξύ (παράγωγο του υδροξυβενζοϊκού οξέος)
Βανιλίνη	280	20,633	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>		Φαινολική αλδεϋδη (παράγωγο της υδροξυβενζαλδεϋδης)
Καφεϊκό οξύ	320	21,139	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>		Φαινολικό οξύ (παράγωγο του υδροξυκινναμωμικού οξέος)
Συριγγικό οξύ	280	22,805	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>		Φαινολικό οξύ (παράγωγο του υδροξυβενζοϊκού οξέος)
Συριγγαλδεϋδη	320	26,724	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>		Φαινολική αλδεϋδη (παράγωγο της υδροξυβενζαλδεϋδης)
Ακετοσυριγγόνη	320	33,548	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>		Ακετοφαινόνη
Λαρισιρεσινόλη	280	54,074	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>		Λιγνάνη
Ελλαγικό οξύ	254	55,447	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>		Ελλαγιταννίνη
Ισοραμνετίνη	254	62,631	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>		Φλαβονοειδές (φλαβονόλη)

Στον πίνακα 4.2 παρουσιάζονται για τα δέκα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν το μήκος κύματος της απορρόφησής τους, ο χρόνος έκλουσης, ο χημικός τύπος και η κατηγορία των φαινολικών ουσιών στην οποία ανήκουν. Από αυτές τις δέκα φαινολικές ενώσεις τέσσερις αποτελούν φαινολικά οξέα (γαλλικό, συριγγικό, βανιλικό και καφεϊκό οξύ), δύο είναι αλδεΐδες (συριγγαλδεΐδη και βανιλίνη), καθώς και ταυτοποιήθηκαν ακόμα μία ακετοφαινόνη (ακετοσυριγγόνη), μία λιγνάνη (λαρισιρεσινόλη), μία ελλαγιταννίνη (ελλαγικό οξύ) και ένα φλαβονοειδές (ισορεμνατίνη). Η ισορεμνατίνη είναι μία φλαβονόλη, και πιο συγκεκριμένα το 3'-μεθυλιωμένο παράγωγο της κερκετίνης. Ορισμένα από αυτά προέρχονται από τον κατακερματισμό της λιγνίνης μετά από την όξινη θειώδη πολυτοποίηση του ξύλου *E. globulus*, ενώ άλλα, κυρίως τα μικρού μοριακού βάρους φαινολικά οξέα και αλδεΐδες, υπάρχουν ως φυσικά φαινολικά συστατικά στο δέντρο *E. globulus* (Cruz *et al.*, 2005).

### **4.3. Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων**

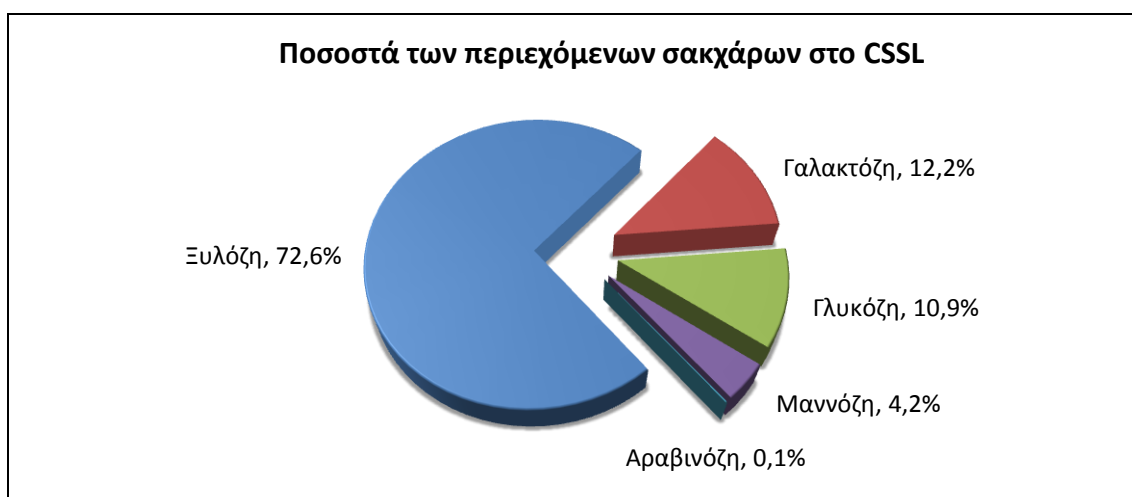
#### **4.3.1. Σάκχαρα που περιέχονται στο απόβλητο CSSL**

Τα περιεχόμενα σάκχαρα στο απόβλητο CSSL, και κατά συνέπεια και τα επιλεγόμενα σάκχαρα στο μίγμα των καθαρών σακχάρων, αποτελούνται από πεντόζες και εξόζες. Συγκεκριμένα το απόβλητο περιέχει δύο πεντόζες, τη ξυλόζη και την αραβινόζη, και τρεις εξόζες, τη γλυκόζη, τη μαννόζη και τη γαλακτόζη. Το απόβλητο CSSL αραιώθηκε δέκα φορές έτσι ώστε οι συγκεντρώσεις των περιεχόμενων λιγνοσουλφονικών, των φαινολικών ενώσεων και του οξικού οξέος να είναι πιο χαμηλές για να μπορεί να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός. Οι συγκεντρώσεις των σακχάρων στο αραιωμένο 1:10 CSSL φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 4.3 και στο γράφημα 4.8 παρουσιάζεται το ποσοστό του κάθε σακχάρου επί των ολικών σακχάρων του αποβλήτου.



Πίνακας 4.3: Συγκεντρώσεις και χαρακτηριστικά σακχάρων στο αραιωμένο 1:10 CSSL

	Χημικός τύπος	Μοριακή μάζα, (g·mol <sup>-1</sup> )	Συγκέντρωση, (g·L <sup>-1</sup> )	Ποσοστό επί των ολικών σακχάρων, %
<b>Σάκχαρα</b>			17,64	100,0
<b>Ξυλόζη</b>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,16	12,81	72,6
<b>Γαλακτόζη</b>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	150,13	2,15	12,2
<b>Γλυκόζη</b>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,16	1,92	10,9
<b>Μαννόζη</b>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,16	0,74	4,2
<b>Αραβινόζη</b>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	150,13	0,02	0,1



Γράφημα 4.8: Ποσοστά των περιεχόμενων σακχάρων στο απόβλητο CSSL

#### 4.3.2. Περιορισμοί και ρύθμιση συνθηκών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Η διαδικασία της ζύμωσης του αποβλήτου και των καθαρών σακχάρων διεξάγεται υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η ζύμωση πραγματοποιείται σε μία ορισμένη περιοχή pH και για τα βακτήρια *A. succinogenes* και *B. succiniciproducens* αυτή είναι μεταξύ 6,0 και 7,2 με το βέλτιστο pH για τη ζύμωση να είναι η τιμή 6,8 (Wan *et al.*, 2008). Κάτω από τιμή pH 6,0, μικρή ανάπτυξη των κυττάρων λαμβάνει χώρα λόγω της αυξημένης ανάγκης να συντηρηθούν τα κύτταρα (Lee *et al.*, 2002).

Καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, παράγεται ηλεκτρικό οξύ, καθώς και τα παραπροϊόντα γαλακτικό, μυρμηκικό και οξικό οξύ. Εξαιτίας αυτών των οξέων που παράγονται, πρέπει να ρυθμίζεται το pH ώστε να διατηρηθεί η τιμή του κοντά στη

βέλτιστη. Αυτό γίνεται μέσω της προσθήκης  $MgCO_3$ , το οποίο αυξάνει το pH και δίνει το αντίστοιχο άλας μαγνησίου (McKinlay *et al.*, 2007-a). Εάν πολύ μεγάλη ποσότητα  $MgCO_3$  προστεθεί στο σύστημα, η όσμωση του διαλύματος αλλάζει και τα κύτταρα υφίστανται κροκίδωση, δηλαδή σχηματίζουν συσσωματώματα, και η παραγωγικότητά τους μειώνεται καθώς χρησιμοποιείται η ενέργεια για τη συντήρηση των κυττάρων και όχι για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Liu *et al.*, 2008-a).

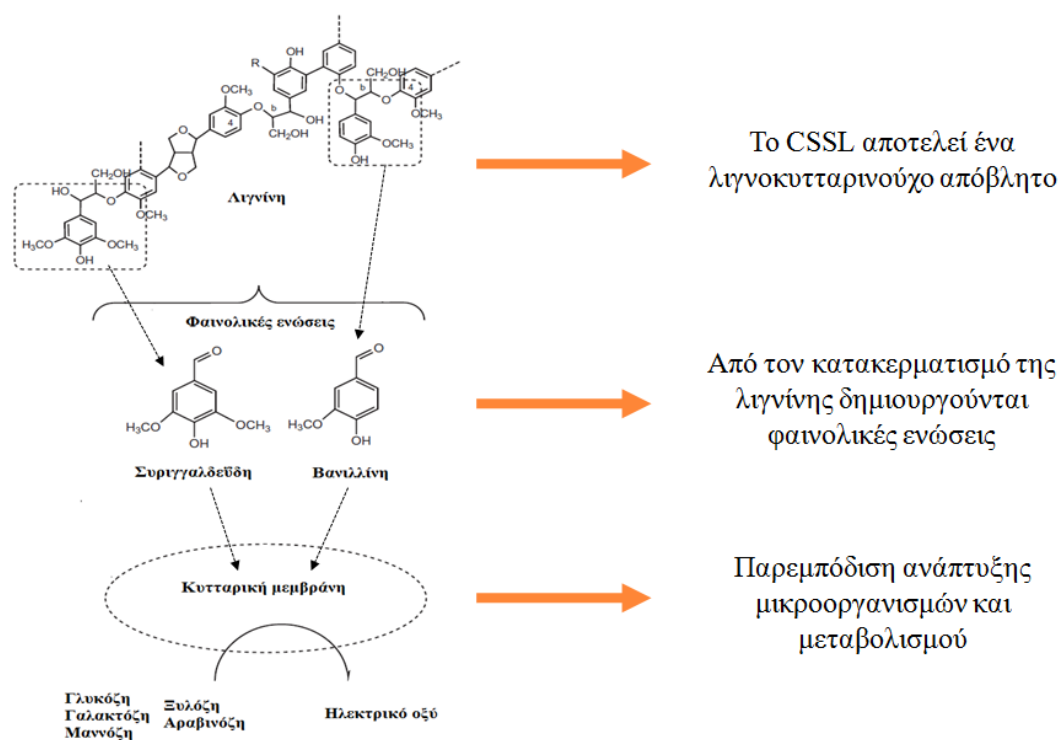
Επιπλέον, το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την αντίδραση παραγωγής οξαλοξικού από το PEP είναι η PEP-καρβοξυκινάση, η οποία ρυθμίζεται από την ποσότητα του  $CO_2$  στο σύστημα. Όταν διοξείδιο του άνθρακα προστίθεται μέχρι κορεσμού στη ζύμωση, αυξάνουν τα επίπεδα παραγωγής ηλεκτρικού οξέος (Song *et al.*, 2007). Η προσθήκη του  $MgCO_3$  θεωρείται συμπληρωματική της προσθήκης του διοξειδίου του άνθρακα για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, η οποία μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως ρυθμιστικό διάλυμα για το pH. Η πρώτη, βέβαια, σε μεγάλες ποσότητες ενέχει τον κίνδυνο της παρεμπόδισης της παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και της ανάπτυξη των κυττάρων με τη συσσώρευση των αλάτων του μαγνησίου (Lin *et al.*, 2008; Samuelon *et al.*, 1991). Λόγω της παρεμπόδισης από τα άλατα μαγνησίου και του γεγονότος ότι η PEP-καρβοξυκινάση ρυθμίζεται από την ποσότητα του  $CO_2$ , είναι προτιμότερο να λαμβάνει χώρα παροχή αερίου διοξειδίου του άνθρακα σε μεγάλες ποσότητες και να χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα  $MgCO_3$  (Song *et al.*, 2007).

Ο σχηματισμός των παραπροϊόντων μπορεί, επίσης, να παρεμποδίσει τη ζύμωση, επειδή επιδρούν ανασταλτικά στην παραγωγή του κύριου προϊόντος μειώνοντας την παραγόμενη συγκέντρωσή του. Τα παραπροϊόντα, όπως το οξικό, το γαλακτικό και το μυρμηκικό οξύ, μπορούν να περιορίσουν την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, με αποτέλεσμα να μειώνεται η απόδοση του επιθυμητού κύριου προϊόντος (Huh *et al.*, 2006).

#### 4.3.3. Ζυμώσεις με θρεπτικό υπόστρωμα το απόβλητο CSSL

Πραγματοποιήθηκε σειρά μικροβιακών ζυμώσεων με θρεπτικό υπόστρωμα το απόβλητο CSSL (επεξεργασμένο ή μη) για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Αρχικά, παράχθηκε ηλεκτρικό οξύ με τη χρήση των βακτηρίων *A. succinogenes* και *B. succiniciproducens* με θρεπτικό μέσο το CSSL και μετά ακολούθησαν ζυμώσεις με το προεπεξεργασμένο (χωρίς φαινολικά συστατικά) απόβλητο. Χρησιμοποιήθηκε το εκχυλισμένο CSSL με δύο από τους πέντε οργανικούς διαλύτες που δοκιμάστηκαν, με αυτούς τους διαλύτες όπου η ανάκτηση των φαινολικών συστατικών ήταν η υψηλότερη βάσει των αποτελεσμάτων της μεθόδου Folin-Ciocalteu, τον οξικό αιθυλεστέρα και το χλωροφόρμιο.

Σκοπός αυτών των ζυμώσεων ήταν η μελέτη της παρεμπόδισης των δύο αυτών βακτηρίων από τα περιεχόμενα φαινολικά συστατικά που περιέχονται στο CSSL. Από την ανάλυση που έχει ήδη προηγηθεί το CSSL περιέχει  $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  φαινολικά. Ο διαχωρισμός τους αποτελεί ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αφού λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης επηρεάζουν την παραγωγή του επιθυμητού παραγόμενου ηλεκτρικού οξέος (εικόνα 4.4) (Garrote *et al.*, 2004; Xi *et al.*, 2013). Επιλέχτηκε, λοιπόν, το εκχυλισμένο CSSL με τον οξικό αιθυλεστέρα, όπου είχε πραγματοποιηθεί αφαίρεση 76% των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών με πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, και το εκχυλισμένο CSSL με το χλωροφόρμιο, όπου είχε πραγματοποιηθεί αφαίρεση 34% των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών με μικρότερη αλλά και πάλι πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα.



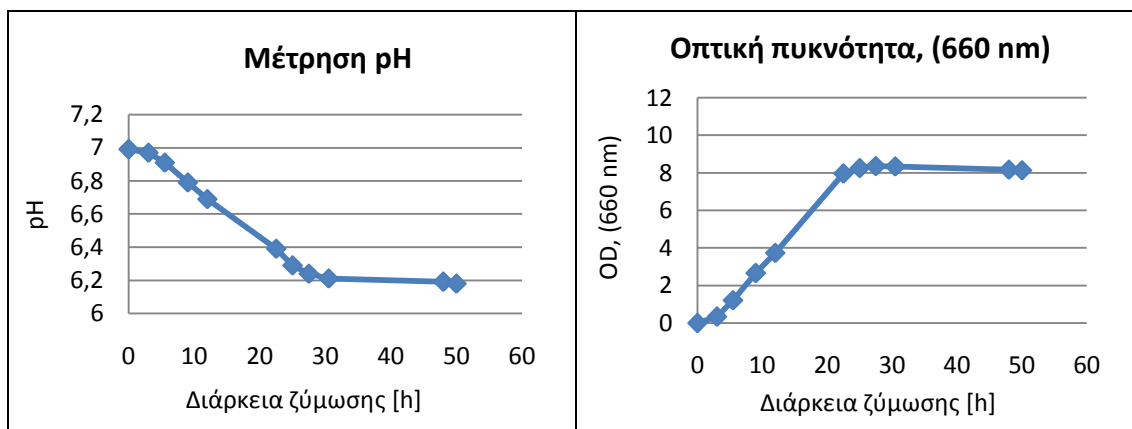
Εικόνα 4.4: Επίδραση φαινολικών συστατικών του αποβλήτου CSSL στους μικροοργανισμούς

Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραφήματα από αυτές τις ζυμώσεις που παρέχουν πληροφορίες για την τιμή του pH, την οπτική πυκνότητα της κυτταρικής βιομάζας, των καταναλωθέντων σακχάρων, του παραγόμενου ηλεκτρικού οξέος αλλά και των παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Στα συγκεκριμένα πειράματα και οι δύο μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν και παρήγαγαν ηλεκτρικό οξύ σε όλα τα

υποστρώματα παρουσιάζοντας, όμως, παρεμπόδιση από τις φαινολικές ουσίες όταν αυτές δεν είχαν αφαιρεθεί από το υπόστρωμα της ζύμωσης. Επίσης, για να συγκριθούν η απόδοση και η παραγωγικότητα των δύο μικροοργανισμών στα διαφορετικά υποστρώματα φτιάχτηκαν γραφήματα όπου φαίνεται στις 50 h η απόδοση και η παραγωγικότητα του ηλεκτρικού οξέος, όπως και η απόδοση των παραπροϊόντων.

#### 4.3.3.1. Ασυνεχής ζύμωση του αραιωμένου 1:10 CSSL με το βακτήριο *B. succiniciproducens*

Το γράφημα 4.9 δείχνει τις τιμές του pH καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Φαίνεται πως με την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος και των υπόλοιπων οξέων, που αποτελούν τα παραπροϊόντα, το pH μειώθηκε από την τιμή 7 που ήταν αρχικά στην τιμή 6,2. Επιπλέον, η μέγιστη κυτταρική βιομάζα παρατηρήθηκε στις 27,5 h δίνοντας τιμή οπτικής πυκνότητας περίπου 8,5 (γράφημα 4.10). Όμως αυτή η τιμή της απορρόφησης δεν εκφράζει μόνο την κυτταρική βιομάζα αλλά και διάφορες άλλες ουσίες τις οποίες περιέχει το απόβλητο CSSL. Οπότε η οπτική πυκνότητα λαμβάνεται υπόψη μόνο για συγκριτικούς λόγους σε σχέση με την αύξηση του μικροοργανισμού στις επόμενες ζυμώσεις.

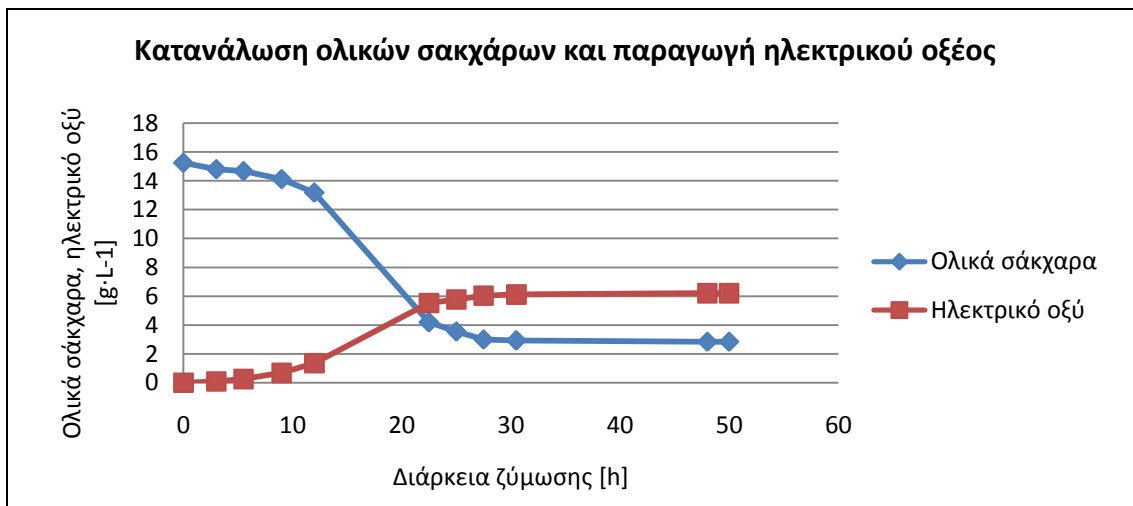


Γράφημα 4.9: Μέτρηση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

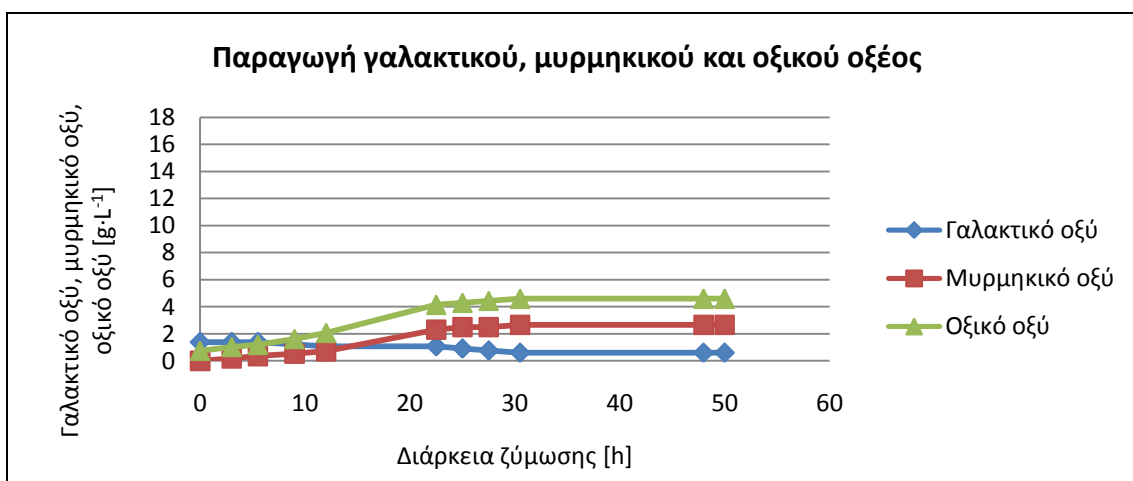
Γράφημα 4.10: Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας μέσω οπτικής πυκνότητας

Στο γράφημα 4.11 φαίνεται η πορεία της ζύμωσης ως προς την κατανάλωση των σακχάρων και την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος από τον *B. succiniciproducens*. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 50 h. Συνολικά καταναλώθηκαν

12,4 g·L<sup>-1</sup> σακχάρων και παράχθηκαν 6,2 g·L<sup>-1</sup> ηλεκτρικού οξέος με απόδοση 0,50 g·g<sup>-1</sup>. Η παραγωγικότητα της ζύμωσης στις 50 h ήταν 0,12 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>.



Γράφημα 4.11: Συγκέντρωση ολικών σακχάρων και ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης



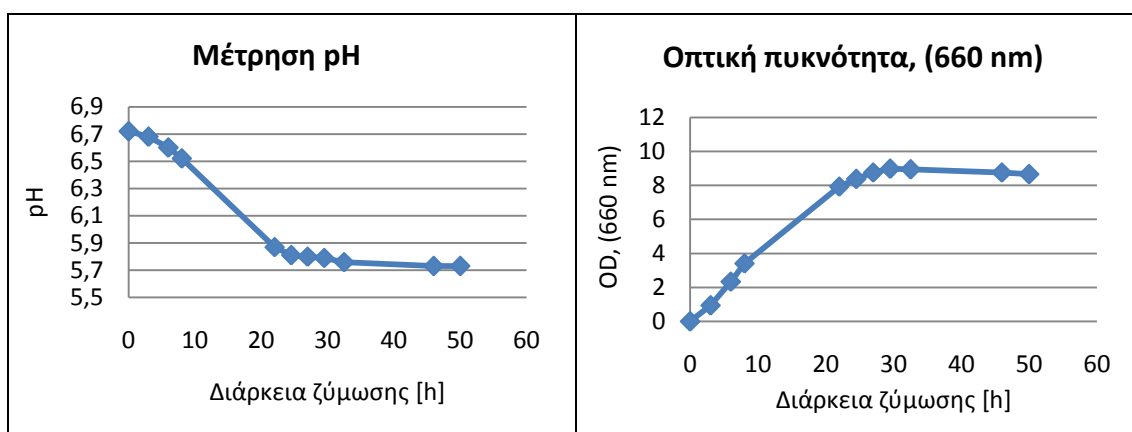
Γράφημα 4.12: Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Οι συγκεντρώσεις των παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρουσιάζονται στο γράφημα 4.12. Συγκεκριμένα, παράχθηκαν 3,8 g·L<sup>-1</sup> οξικού οξέος και 2,7 g·L<sup>-1</sup> μυρμηκικού οξέος, ενώ το γαλακτικό οξύ είχε αρχικά μικρή συγκέντρωση, 1,4 g·L<sup>-1</sup>, και στη συνέχεια καταναλώθηκε. Οι αναλογίες παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς οξικό οξύ και προς μυρμηκικό οξύ ήταν 1,6:1 και 2,3:1,

αντίστοιχα. Αυτές οι αναλογίες θεωρούνται μικρές και δείχνουν πως η ποσότητα των παραπροϊόντων είναι σημαντική, κυρίως του οξικού οξέος.

#### 4.3.3.2. Ασυνεχής ζύμωση του εκχυλισμένου με χλωροφόρμιο CSSL με το βακτήριο *B. succiniciproducens*

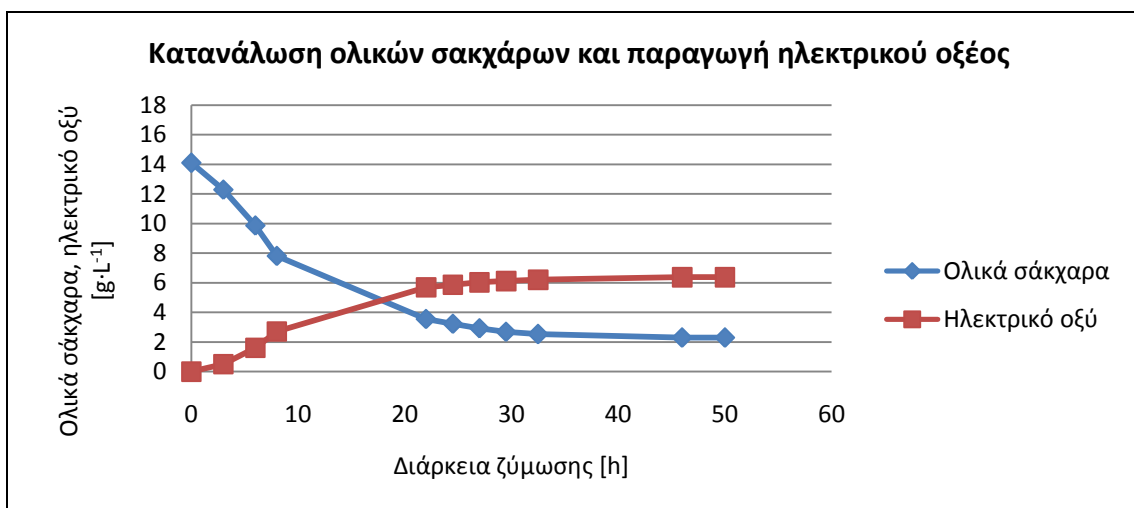
Το pH μειώθηκε από την τιμή 6,7 που ήταν αρχικά στην τιμή 5,7 λόγω της παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος και των παραπροϊόντων (γράφημα 4.13). Στο γράφημα 4.14 φαίνεται πως η μέγιστη κυτταρική βιομάζα παρατηρήθηκε στις 29,5 h δίνοντας τιμή οπτικής πυκνότητας περίπου 9, αυξήθηκε, δηλαδή, κατά 0,5 από τη μέγιστη τιμή που παρατηρήθηκε στη ζύμωση με το ακατέργαστο CSSL. Άρα, έστω και μικρή ανάκτηση των φαινολικών συστατικών (34%) μετά από εκχύλιση με χλωροφόρμιο βελτίωσε την αύξηση του μικροοργανισμού κατά 5,9%.



Γράφημα 4.13: Μέτρηση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

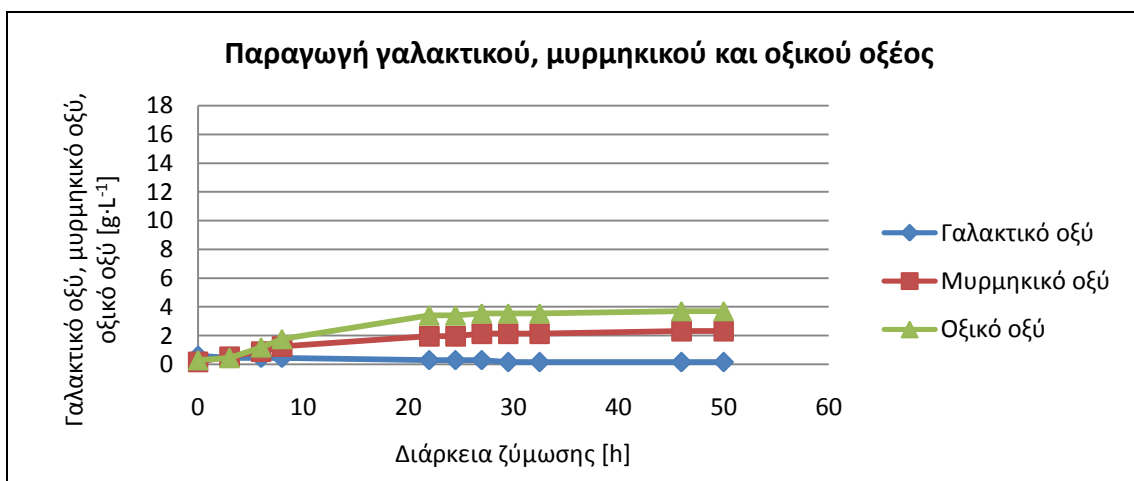
Γράφημα 4.14: Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας μέσω οπτικής πυκνότητας

Συνολικά καταναλώθηκαν  $11,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σακχάρων στις 50 h και παράχθηκαν  $6,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ηλεκτρικού οξέος με απόδοση  $0,54 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  (γράφημα 4.15). Η παραγωγικότητα της ζύμωσης στις 50 h ήταν  $0,13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .



*Γράφημα 4.15: Συγκέντρωση ολικών σακχάρων και ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης*

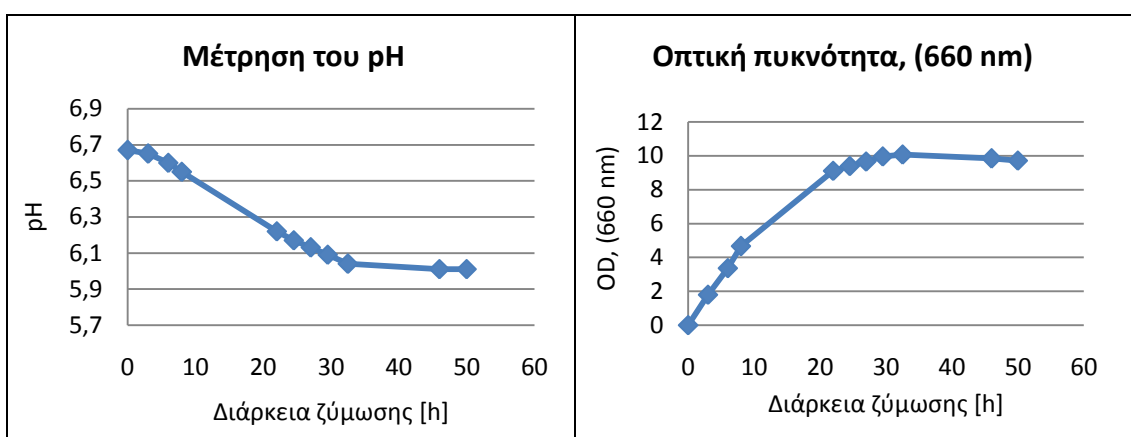
Το οξικό οξύ είχε και πάλι τη μεγαλύτερη συγκέντρωση,  $3,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , σε σχέση με το μυρμηκικό οξύ που ήταν  $2,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ενώ το γαλακτικό οξύ είχε αρχικά πολύ μικρή συγκέντρωση,  $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , και στη συνέχεια καταναλώθηκε σχεδόν όλη η ποσότητα αφού έμειναν μόνο  $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (γράφημα 4.16). Οι αναλογίες παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς το κάθε παραπροϊόν αυξήθηκαν σε 1,9:1 για το οξικό οξύ και 3:1 για το μυρμηκικό οξύ.



*Γράφημα 4.16: Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης*

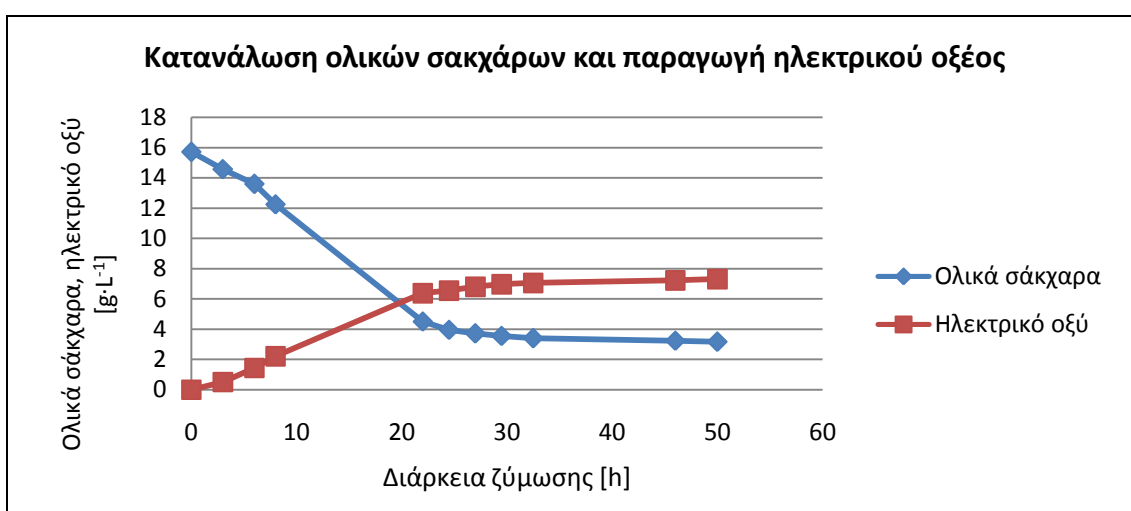
#### 4.3.3.3. Ασυνεχής ζύμωση του εκχυλισμένου με οξικό αιθυλεστέρα CSSL με το βακτήριο *B. succiniciproducens*

Στο γράφημα 4.17 φαίνεται πως το pH μειώνεται στην τιμή 6 στις 50 h. Η μέγιστη κυτταρική βιομάζα δίνει τιμή οπτικής πυκνότητας περίπου 10,5, αυξημένη κατά 2 από την μέγιστη τιμή που παρατηρήθηκε στη ζύμωση με το ακατέργαστο CSSL (γράφημα 4.18). Άρα, μετά από ανάκτηση 76% των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών με εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα βελτιώθηκε η αύξηση του μικροοργανισμού κατά 23,5%.



Γράφημα 4.17: Μέτρηση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Γράφημα 4.18: Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας μέσω οπτικής πυκνότητας

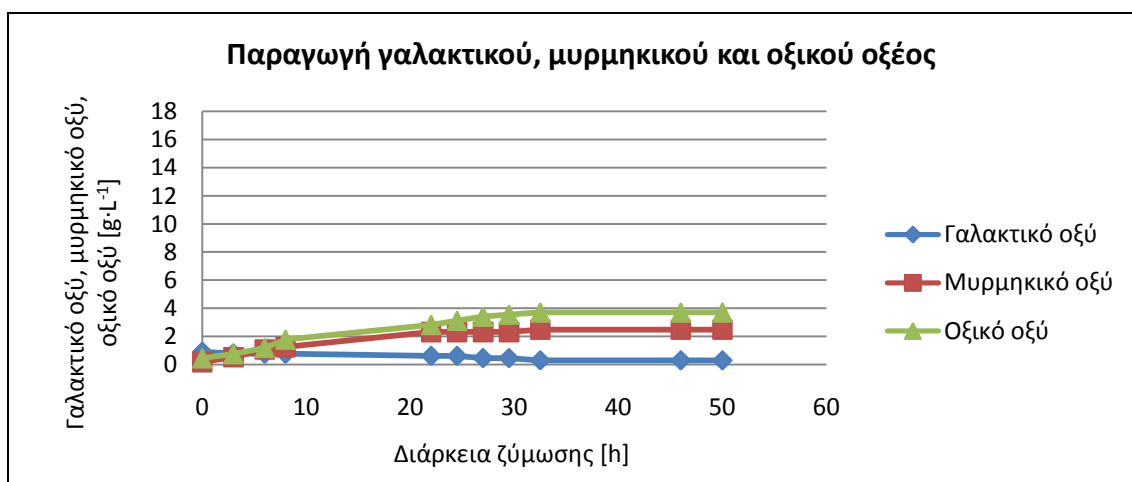


Γράφημα 4.19: Συγκέντρωση ολικών σακχάρων και ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης



Η συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος μετά από 50 h ήταν  $7,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ενώ συνολικά καταναλώθηκαν  $12,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σακχάρων (γράφημα 4.19). Η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος ήταν  $0,58 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  και η παραγωγικότητα της ζύμωσης ήταν  $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

Στο γράφημα 4.20 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Το οξικό οξύ που παράχθηκε είχε συγκέντρωση  $3,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  με την αναλογία παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς οξικό οξύ να αυξάνει σε 2,2:1, ενώ το μυρμηκικό οξύ είχε συγκέντρωση  $2,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και η αντίστοιχη αναλογία ήταν 3,2:1. Αυτές οι αναλογίες θεωρούνται ακόμα μικρές και άρα η ποσότητα του οξικού οξέος και του μυρμηκικού οξέος δεν μπορούν να αγνοηθούν. Επιπλέον, το γαλακτικό οξύ είχε αρχικά μικρή συγκέντρωση,  $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , και στη συνέχεια καταναλώθηκε αφού έμειναν μόνο  $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

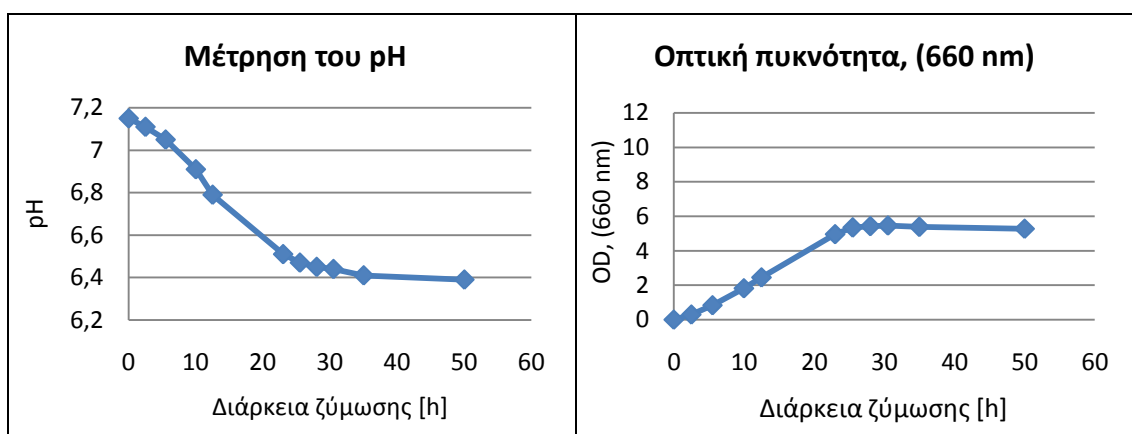


Γράφημα 4.20: Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Είναι εμφανές από τα πειραματικά αποτελέσματα πως λόγω της αφαίρεσης των φαινολικών συστατικών που περιέχονται στο CSSL, είτε με χλωροφόρμιο είτε με οξικό αιθυλεστέρα, το βακτήριο *B. succiniciproducens* αναπτύσσεται περισσότερο από ότι στο ακατέργαστο CSSL. Επιπλέον παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα ηλεκτρικού οξέος αποδεικνύοντας την παρεμπόδιση των φαινολικών ενώσεων στον μεταβολισμό του βακτηρίου. Εξαιτίας του γεγονότος ότι το βακτήριο *B. succiniciproducens* αποτελεί ένα νέο μέλος της οικογένειας Pasteurellaceae (Becker *et al.*, 2013) και δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα, δεν έχει ερευνηθεί η παρεμπόδισή του από φαινολικές ενώσεις. Αντιθέτως το βακτήριο *A. succinogenes* έχει μελετηθεί περισσότερο.

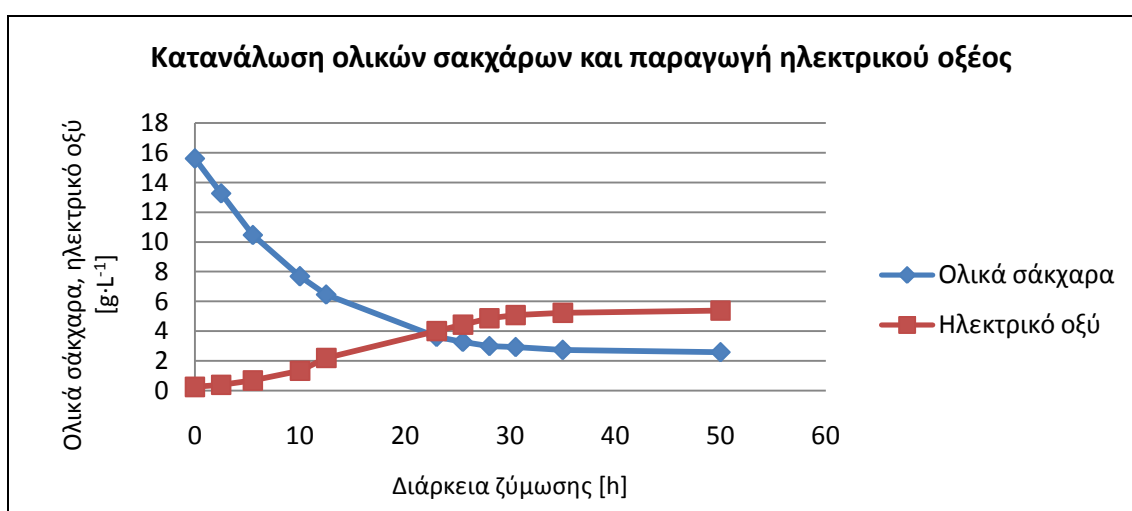
#### 4.3.3.4. Ασυνεχής ζύμωση του αραιωμένου 1:10 CSSL με το βακτήριο *A. succinogenes*

Το γράφημα 4.21 δείχνει τις τιμές του pH καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης με χρήση του βακτηρίου *A. succinogenes*. Φαίνεται πως λόγω της παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος και των παραπροϊόντων, το pH μειώθηκε στην τιμή 6,4. Η μέγιστη κυτταρική βιομάζα που παράχθηκε δίνει τιμή οπτικής πυκνότητας 5,5 (γράφημα 4.22), μικρότερη από την μέγιστη τιμή της κυτταρικής βιομάζας που παράχθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *B. succiniciproducens*.



Γράφημα 4.21: Μέτρηση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

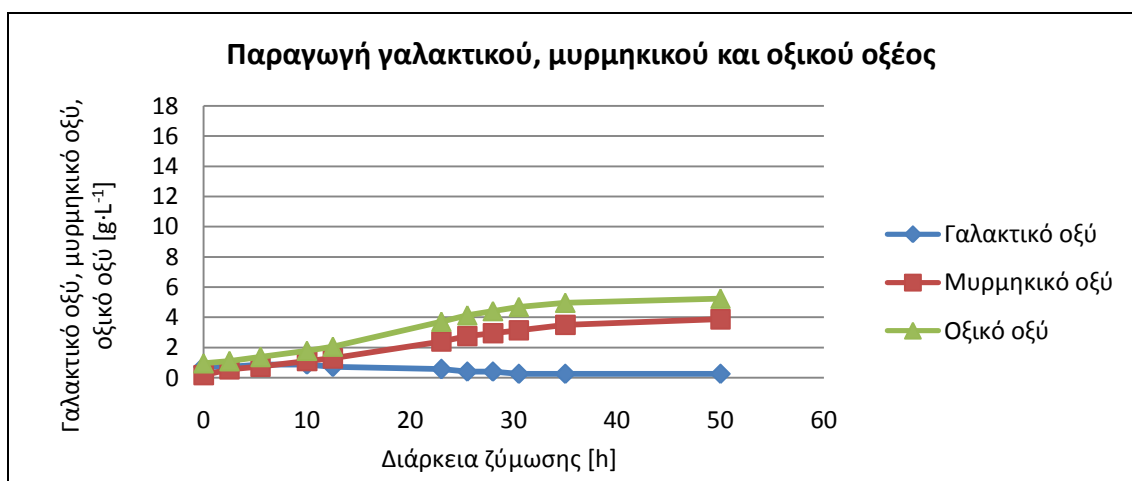
Γράφημα 4.22: Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας μέσω οπτικής πυκνότητας



Γράφημα 4.23: Συγκέντρωση ολικών σακχάρων και ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Η κατανάλωση των σακχάρων και η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος από τον *A. succinogenes* φαίνεται στο *γράφημα 4.23*. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 50 h. Συνολικά καταναλώθηκαν  $13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σακχάρων και παράχθηκαν  $5,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ηλεκτρικού οξέος με απόδοση  $0,39 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Η παραγωγικότητα της ζύμωσης στις 50 h ήταν  $0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

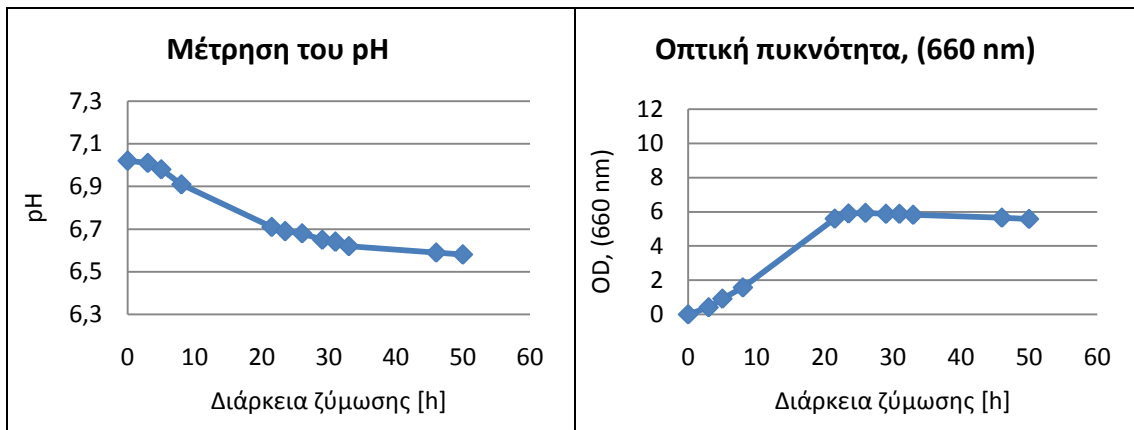
Οι συγκεντρώσεις των παραπροϊόντων που παράχθηκαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρουσιάζονται στο *γράφημα 4.24*, με το οξικό οξύ να έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση,  $4,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Η συγκέντρωση του παραχθέντος μυρμηκικού οξέος στις 50 h ήταν  $3,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ενώ το γαλακτικό οξύ είχε αρχικά μικρή συγκέντρωση,  $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , και στο τέλος της ζύμωσης έμειναν μόνο  $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Οι αναλογίες παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς οξικό οξύ και προς μυρμηκικό οξύ ήταν 1,2:1 και 1,4:1, αντίστοιχα, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *B. succiniciproducens* οι αναλογίες αυτές ήταν μεγαλύτερες.



Γράφημα 4.24: Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

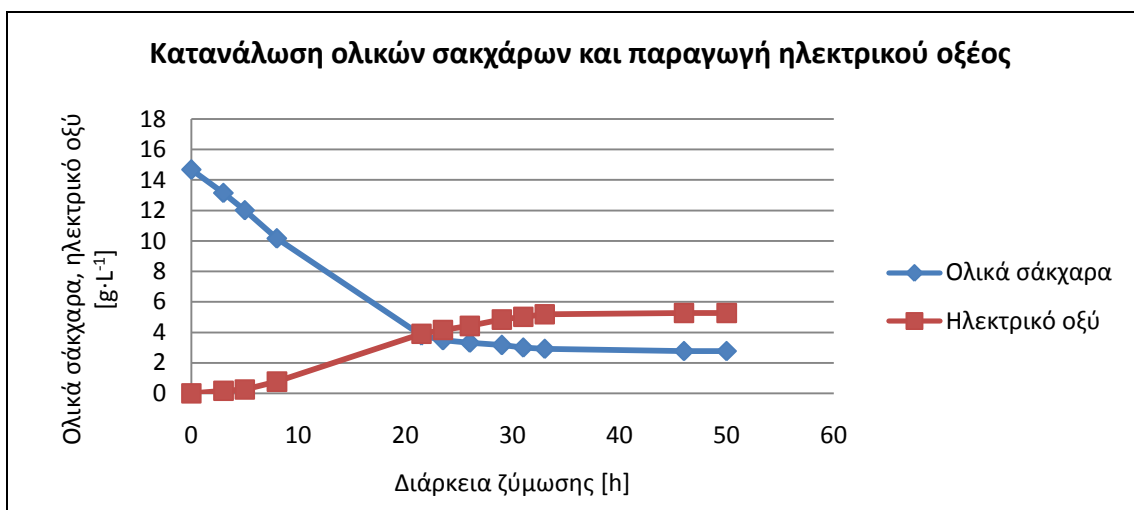
#### 4.3.3.5. Ασυνεχής ζύμωση του εκχυλισμένου με χλωροφόρμιο CSSL με το βακτήριο *A. succinogenes*

Το pH μειώθηκε από την τιμή 7 που ήταν αρχικά στην τιμή 6,6 (*γράφημα 4.25*). Η μέγιστη τιμή οπτικής πυκνότητας της παραχθείσας κυτταρικής βιομάζας ήταν 5,9 (*γράφημα 4.26*), μεγαλύτερη κατά 0,4 από τη μέγιστη τιμή που παρατηρήθηκε στη ζύμωση με το ακατέργαστο CSSL. Άρα, έστω και μικρή ανάκτηση των φαινολικών συστατικών (34%) μετά από εκχύλιση με χλωροφόρμιο βελτίωσε την αύξηση του μικροοργανισμού κατά 7,3%.



Γράφημα 4.25: Μέτρηση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

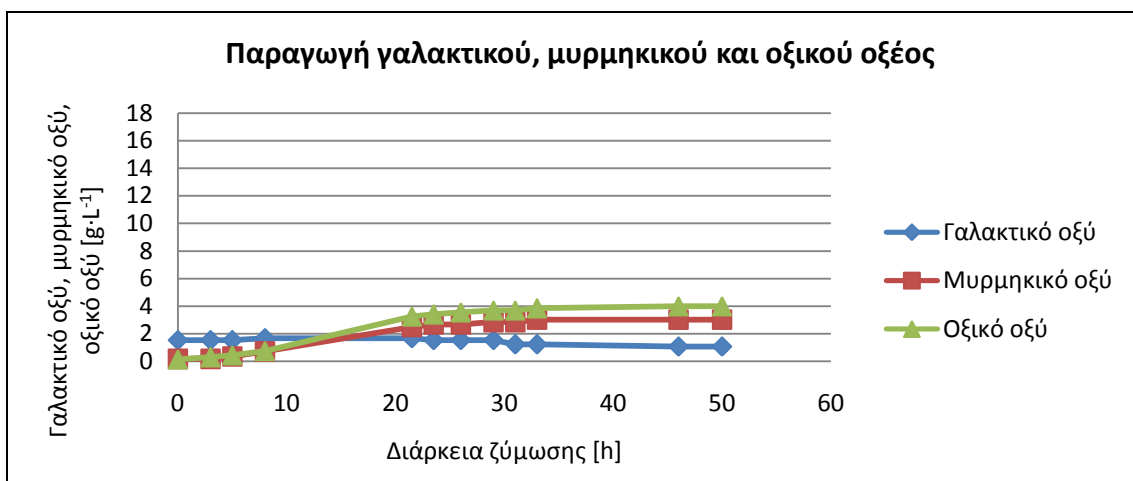
Γράφημα 4.26: Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας μέσω οπτικής πυκνότητας



Γράφημα 4.27: Συγκέντρωση ολικών σακχάρων και ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Στο γράφημα 4.27 φαίνεται πως συνολικά καταναλώθηκαν  $11,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σακχάρων στις 50 h και παράχθηκαν  $5,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ηλεκτρικού οξέος με απόδοση  $0,44 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Η παραγωγικότητα της ζύμωσης ήταν  $0,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

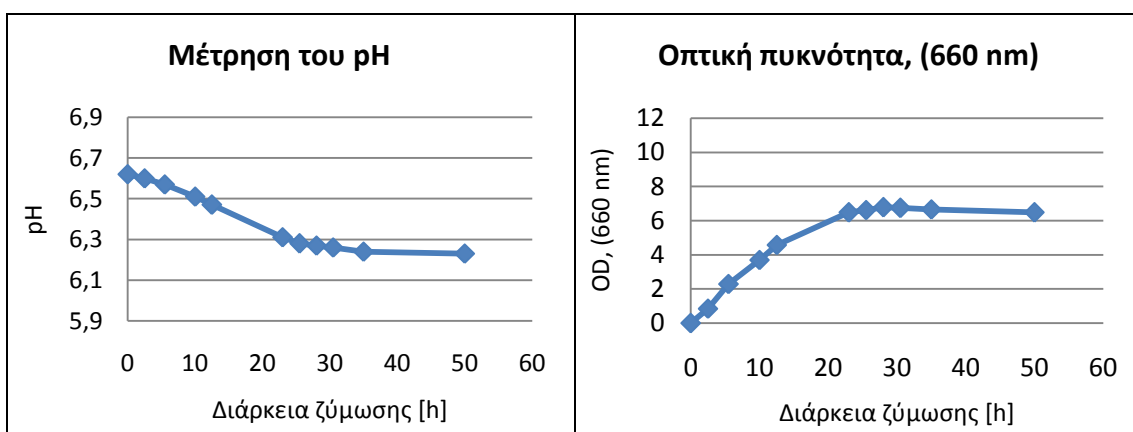
Το οξικό οξύ είχε και πάλι τη μεγαλύτερη συγκέντρωση,  $3,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , σε σχέση με το μυρμηκικό οξύ που είχε  $2,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Το γαλακτικό οξύ είχε αρχικά συγκέντρωση  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και μέχρι το τέλος της ζύμωσης καταναλώθηκαν μόνο τα  $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , οπότε παρέμειναν  $1,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (γράφημα 4.28). Οι αναλογίες παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς το κάθε παραχθέν παραπροϊόν αυξήθηκαν σε 1,4:1 για το οξικό οξύ και 1,9:1 για το μυρμηκικό οξύ.



Γράφημα 4.28: Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

#### 4.3.3.6. Ασυνεχής ζύμωση του εκχυλισμένου με οξικό αιθυλεστέρα CSSL με το βακτήριο *A. succinogenes*

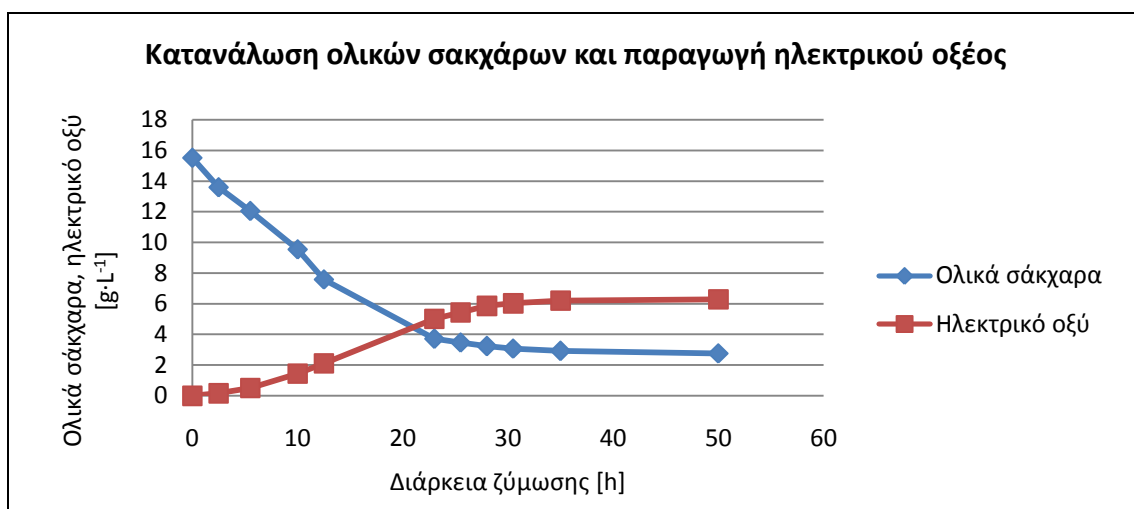
Η τιμή του pH μειώθηκε σε 6,2 (γράφημα 4.29). Η μέγιστη κυτταρική βιομάζα που παράχθηκε είχε τιμή οπτικής πυκνότητας 6,8 (γράφημα 4.30), μεγαλύτερη κατά 1,3 από την μέγιστη τιμή που παρατηρήθηκε στη ζύμωση με το ακατέργαστο CSSL. Άρα, μετά από ανάκτηση 76% των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών με εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα βελτιώθηκε η αύξηση του μικροοργανισμού κατά 23,6%.



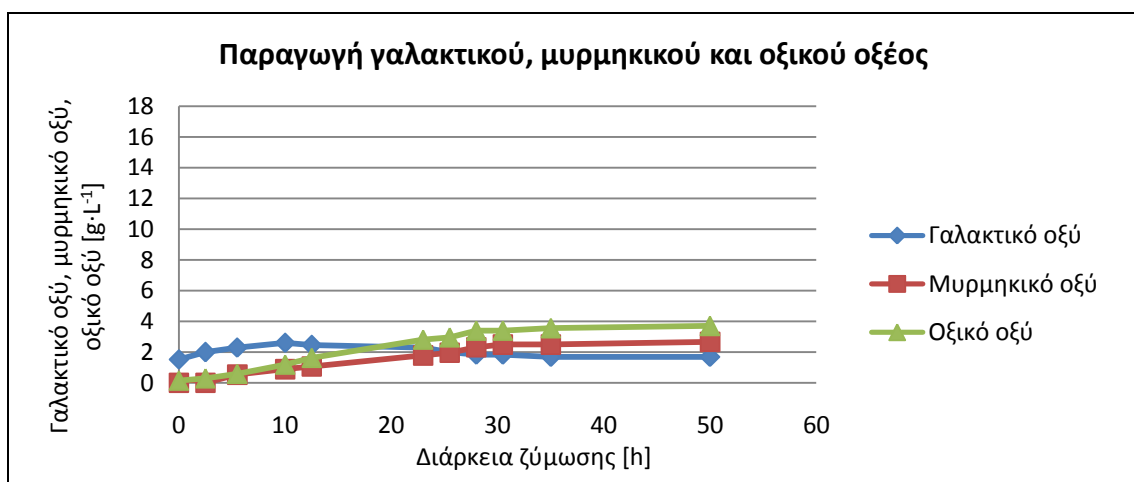
Γράφημα 4.29: Μέτρηση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Γράφημα 4.30: Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας μέσω οπτικής πυκνότητας

Στο γράφημα 4.31 φαίνεται πως συνολικά καταναλώθηκαν  $12,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σακχάρων στις 50 h και παράχθηκαν  $6,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ηλεκτρικού οξέος με απόδοση  $0,49 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Η παραγωγικότητα της ζύμωσης στις 50 h ήταν  $0,13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .



Γράφημα 4.31: Συγκέντρωση ολικών σακχάρων και ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης



Γράφημα 4.32: Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Το οξικό οξύ που παράχθηκε είχε συγκέντρωση  $3,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  με την αναλογία παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς οξικό οξύ να αυξάνει σε 1,8:1, ενώ το μυρμηκικό οξύ στις 50 h ήταν  $2,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και η αντίστοιχη αναλογία ήταν 2,3:1. Οι ποσότητες του οξικού οξέος και του μυρμηκικού οξέος άρα θεωρούνται σημαντικές. Το γαλακτικό οξύ, αντιθέτως, είχε αρχικά μικρή συγκέντρωση,  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , στη συνέχεια έφτασε την

μέγιστη τιμή  $2,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  στις 10 h και μέχρι τις 50 h καταναλώθηκε αφού έμειναν  $1,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (γράφημα 4.32). Επομένως, στην περίπτωση της ζύμωσης του εκχυλισμένου CSSL με γλωροφόρμιο παράχθηκαν  $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  γαλακτικού οξέος με αναλογία παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς γαλακτικό οξύ 31,5:1.

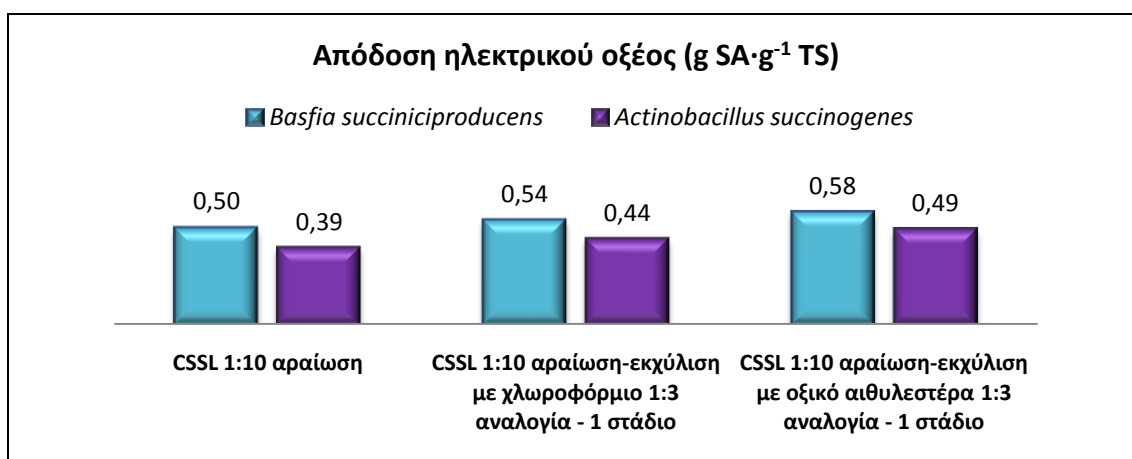
Το βακτήριο *A. succinogenes* αναπτύσσεται, όπως και το βακτήριο *B. succiniciproducens*, περισσότερο και στις δύο περιπτώσεις εκχυλισμένου αποβλήτου σε σχέση με το μη εκχυλισμένο CSSL και, επίσης, παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα ηλεκτρικού οξέος όταν έχει αφαιρεθεί ορισμένη ποσότητα φαινολικών. Για τον μικροοργανισμό *A. succinogenes*, συγκεκριμένα, έχουν πραγματοποιηθεί, επίσης, ζυμώσεις από τους ερευνητές Xi *et al.* (2013) με θρεπτικό υπόστρωμα το απόβλητο βιομηχανίας ζάχαρης, μπαγκάσσα, για να μελετηθεί η ανάπτυξη του βακτηρίου αλλά και η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος πριν και μετά την αφαίρεση φαινολικών συστατικών με επεξεργασία του αποβλήτου με υπερήχους. Οι συνθήκες των ζυμώσεων αυτών ήταν αναερόβιες με συνεχή παροχή  $\text{CO}_2$   $0,5 \text{ vvm}$ , αναδεδυόμενες με ρυθμό 180 rpm και σε θερμοκρασία  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Η αρχική συγκέντρωση των ολικών σακχάρων ήταν  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (ξυλόζη 82,4%, γλυκόζη 11,4% και αραβινόζη 6,2%) και προστέθηκε ίση ποσότητα  $\text{MgCO}_3$  για ρύθμιση του pH.

Πριν αφαιρεθούν οι περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις με αρχική συγκέντρωση  $2,84 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , καταναλώθηκαν  $28,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σάκχαρα και παράχθηκαν  $19,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ηλεκτρικό οξύ, καθώς και  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  μυρμηκικό οξύ και  $9,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  οξικό οξύ. Η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος ήταν  $0,69 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ενώ οι αναλογίες παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς μυρμηκικό και οξικό οξύ ήταν 6,6:1 και 2,1:1, αντίστοιχα. Μετά την ανάκτηση 78,5% των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών η απόδοση της παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος αυξήθηκε κατά 11,6% και η τιμή της συγκέντρωσης του οξικού οξέος που παράχθηκε ως παραπροϊόν μειώθηκε κατά 41,3%. Δεν παρατηρήθηκε αύξηση της ανάπτυξης του βακτηρίου *A. succinogenes* ούτε και μείωση της παραγόμενης συγκέντρωσης του μυρμηκικού οξέος (Xi *et al.*, 2013).

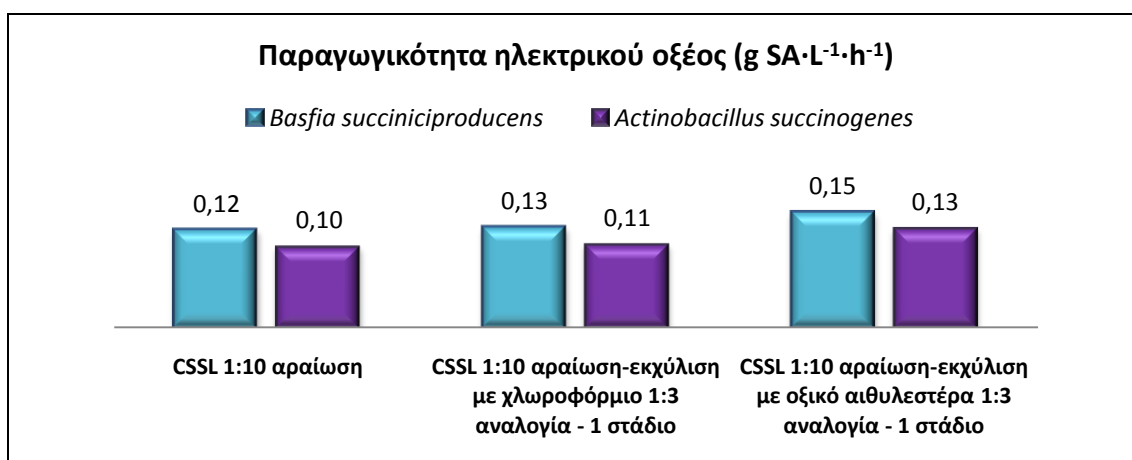
Παρατηρείται, λοιπόν, πως έπειτα από ανάκτηση της μεγαλύτερης ποσότητας των περιεχόμενων φαινολικών ενώσεων στο απόβλητο μπαγκάσσα βελτιώθηκε η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος όπως και στην περίπτωση του αποβλήτου CSSL. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως οι φαινολικές ενώσεις έχουν χαρακτηριστεί από τους Palmqvist και Hahn-Hägerdal (2000-b) ότι αποτελούν τις κύριες παρεμποδιστικές ουσίες στις ζυμώσεις λιγνοκυτταρινούχων υλικών μετά από όξινη υδρόλυσή τους. Το βακτήριο *A. succinogenes*, βέβαια, φαίνεται να χαρακτηρίζεται από ανοχή σε ορισμένη ποσότητα παρεμποδιστικών ουσιών που προέρχονται από την όξινη υδρόλυση των δύο αυτών λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων. Παρόμοια ανοχή επιδεικνύει και το βακτήριο *B. succiniciproducens* αφού και οι δύο αυτοί μικροοργανισμοί κατάφεραν και παρήγαγαν ηλεκτρικό οξύ ακόμα και πριν την αφαίρεση των φαινολικών συστατικών.

#### 4.3.4. Σύγκριση των αποτελεσμάτων των ζυμώσεων με θρεπτικό υπόστρωμα το απόβλητο CSSL και χρήση διαφορετικών βακτηρίων

Στο γράφημα 4.33 φαίνονται οι τιμές απόδοσης παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος των δύο μικροοργανισμών στα διαφορετικά υποστρώματα στις 50 h. Ενώ, το γράφημα 4.34 δείχνει, αντίστοιχα, τις τιμές της παραγωγικότητας του ηλεκτρικού οξέος στις 50 h. Από τα αποτελέσματα των ζυμώσεων φαίνεται ότι το βακτήριο *B. succiniciproducens* ανταποκρίνεται καλύτερα στο υπόστρωμα αραιωμένου 1:10 CSSL, αλλά και μετά την αφαίρεση των φαινολικών συστατικών, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη απόδοση παραγωγής ηλεκτρικού οξέος σε σχέση με το *A. succinogenes* στα ίδια υποστρώματα.



Γράφημα 4.33: Σύγκριση απόδοσης παραγωγής ηλεκτρικού οξέος στις 50 h

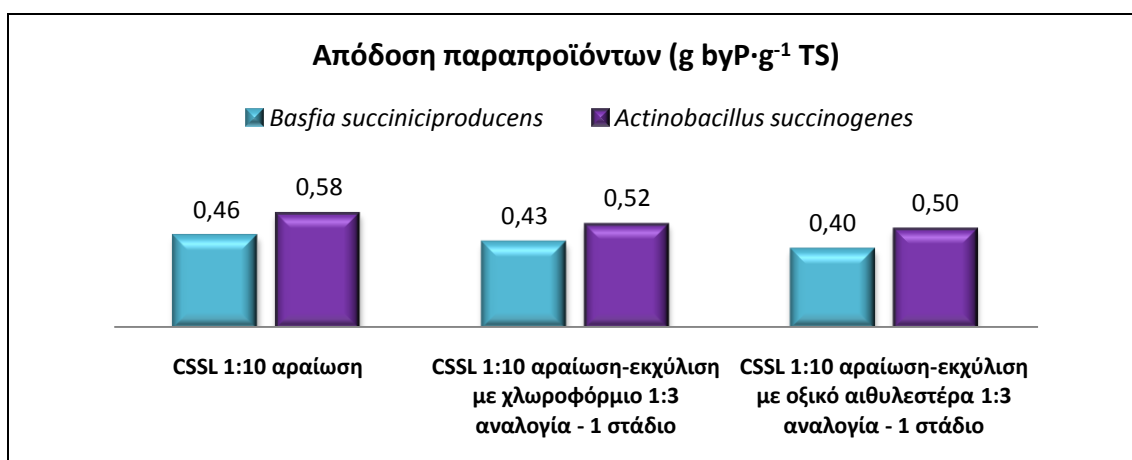


Γράφημα 4.34: Σύγκριση παραγωγικότητας ηλεκτρικού οξέος στις 50 h



Όταν χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *B. succiniciproducens* στη ζύμωση με θρεπτικό υπόστρωμα το CSSL δέκα φορές αραιωμένο η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος ήταν  $0,50 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  και η παραγωγικότητα ήταν  $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Ενώ, όταν χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *A. succinogenes* η απόδοση ήταν  $0,39 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  και η παραγωγικότητα  $0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Στη συνέχεια, αφαιρώντας το 34% των περιεχόμενων φαινολικών ουσιών με εκχύλιση με χλωροφόρμιο τα αποτελέσματα βελτιώθηκαν. Για το βακτήριο *B. succiniciproducens* η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος ήταν  $0,54 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  και η παραγωγικότητα  $0,13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , δηλαδή παρατηρήθηκε αύξηση 8% και 8,3%, αντίστοιχα. Ενώ, για το βακτήριο *A. succinogenes* η απόδοση ήταν  $0,44 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  και η παραγωγικότητα  $0,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , η αντίστοιχη αύξηση, δηλαδή, ήταν 12,8% και 10%.

Στην περίπτωση όπου αφαιρέθηκε το 76% των φαινολικών συστατικών χρησιμοποιώντας οξικό αιθυλεστέρα ως διαλύτη στην εκχύλιση τα αποτελέσματα βελτιώθηκαν ακόμα περισσότερο σε σχέση με το μη επεξεργασμένο απόβλητο. Για το βακτήριο *B. succiniciproducens* η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος ήταν  $0,58 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  και η παραγωγικότητα  $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , δηλαδή παρατηρήθηκε αύξηση 16% και 25%, αντίστοιχα. Ενώ, για το βακτήριο *A. succinogenes* η απόδοση ήταν  $0,49 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  και η παραγωγικότητα  $0,13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , η αντίστοιχη αύξηση, δηλαδή, ήταν 25,6% και 30%.



Γράφημα 4.35: Σύγκριση απόδοσης παραγωγής παραπροϊόντων στις 50 h

Στη συνέχεια, στο γράφημα 4.35 απεικονίζονται οι τιμές αποδόσης των παραπροϊόντων που παράγουν οι δύο μικροοργανισμοί στα διαφορετικά υποστρώματα στις 50 h. Όταν χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *B. succiniciproducens* στη ζύμωση με θρεπτικό υπόστρωμα το CSSL δέκα φορές αραιωμένο η απόδοση των παραπροϊόντων ήταν  $0,46 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ενώ, όταν χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *A. succinogenes* η απόδοση ήταν  $0,58 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Αφαιρώντας το 34% των περιεχόμενων φαινολικών ουσιών με εκχύλιση με χλωροφόρμιο η απόδοση των παραπροϊόντων για

το βακτήριο *B. succiniciproducens* μειώθηκε κατά 6,5% στα 0,43 g·g<sup>-1</sup>. Ενώ, για το βακτήριο *A. succinogenes* η απόδοση ήταν 0,52 g·g<sup>-1</sup>, η αντίστοιχη μείωση, δηλαδή, ήταν 12,8%.

Στην περίπτωση όπου αφαιρέθηκε το 76% των φαινολικών συστατικών χρησιμοποιώντας οξικό αιθυλεστέρα ως διαλύτη στην εκχύλιση η παραγωγή παραπροϊόντων μειώθηκε ακόμα περισσότερο σε σχέση με το μη επεξεργασμένο απόβλητο. Για το βακτήριο *B. succiniciproducens* η απόδοση των παραπροϊόντων ήταν 0,40 g·g<sup>-1</sup>, δηλαδή παρατηρήθηκε μείωση 13%, ενώ, για το βακτήριο *A. succinogenes* η απόδοση ήταν 0,50 g·g<sup>-1</sup>, η αντίστοιχη μείωση, δηλαδή, ήταν 13,8%.

Φαίνεται, λοιπόν, πως το βακτήριο *B. succiniciproducens* παρουσιάζει υψηλότερες τιμές απόδοσης και παραγωγικότητας του ηλεκτρικού οξέος από το βακτήριο *A. succinogenes*, όπως και χαμηλότερες τιμές απόδοσης των παραπροϊόντων. Το βακτήριο *A. succinogenes*, βέβαια, παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό βελτίωσης ως προς την απόδοση και την παραγωγικότητα του ηλεκτρικού οξέος, όταν ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιείται το εκχυλισμένο με οξικό αιθυλεστέρα απόβλητο σε σχέση με το μη επεξεργασμένο CSSL. Αυτό σημαίνει πως ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός παρεμποδίζεται περισσότερο από ότι το βακτήριο *B. succiniciproducens* από τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών που μπορεί να περιέχονται στο μέσο της ζύμωσης.

#### 4.3.5. Ζυμώσεις με θρεπτικό υπόστρωμα καθαρά σάκχαρα

Στη συνέχεια, λόγω της αξιολόγησης των αποτελεσμάτων των προηγούμενων ζυμώσεων επιλέχτηκε το βακτήριο *A. succinogenes* και πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με θρεπτικό υπόστρωμα μίγμα καθαρών σακχάρων, με συγκέντρωση του κάθε σακχάρου όμοια με αυτή του αραιωμένου 1:10 CSSL, και προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος. Επιλέχτηκε το γαλλικό οξύ ως παρεμποδιστική ουσία διότι παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της DPPH•, και εμπεριέχεται σε μεγάλη συγκέντρωση στο απόβλητο σε σχέση με τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με την HPLC.

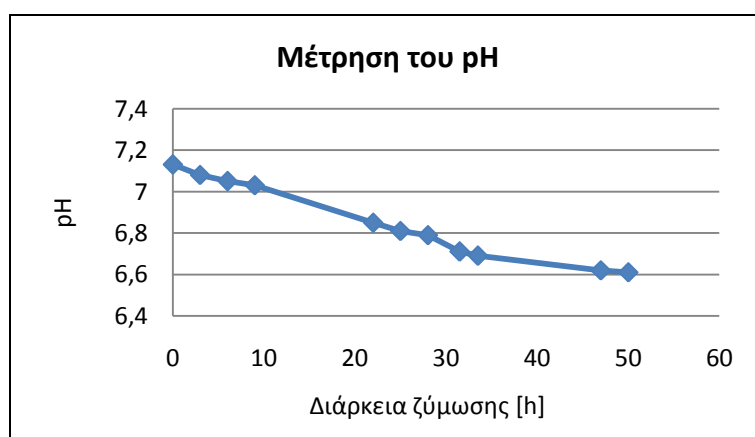
Με τη χρήση του βακτηρίου *A. succinogenes*, αρχικά, παράχθηκε ηλεκτρικό οξύ με θρεπτικό μέσο μίγμα καθαρών σακχάρων και μετά ακολούθησαν ζυμώσεις με προσθήκη γαλλικού οξέος συγκεντρώσεων 0,1 g·L<sup>-1</sup>, 0,5 g·L<sup>-1</sup>, 1 g·L<sup>-1</sup> και 2 g·L<sup>-1</sup>. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχτηκαν για να μελετηθεί η παρεμπόδιση που προκαλεί το γαλλικό οξύ στην παραγωγή του κύριου προϊόντος και στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού ήταν από 0,1 g·L<sup>-1</sup> μέχρι 2 g·L<sup>-1</sup>, αφού στο αραιωμένο 1:10 απόβλητο CSSL η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών είναι περίπου

1,2 g·L<sup>-1</sup>. Ο προσδιορισμός της κυτταρικής βιομάζας πραγματοποιήθηκε αλλά οι τιμές των αποτελεσμάτων δεν θεωρήθηκαν αντιπροσωπευτικές και δεν παρουσιάζονται.

Τα επόμενα γραφήματα παρέχουν πληροφορίες για την τιμή του pH, τις συγκεντρώσεις των καταναλωθέντων σακχάρων, του παραγόμενου ηλεκτρικού οξέος αλλά και των παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Στα συγκεκριμένα πειράματα ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε και παρήγαγε ηλεκτρικό οξύ σε όλα τα υποστρώματα παρουσιάζοντας, όμως, παρεμπόδιση από το γαλλικό οξύ όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του στο διάλυμα της ζύμωσης. Επίσης, για να συγκριθούν η απόδοση και η παραγωγικότητα του ηλεκτρικού οξέος του μικροοργανισμού στα διαφορετικά υποστρώματα σχεδιάστηκαν γραφήματα όπου φαίνεται στις 50 h η απόδοση και η παραγωγικότητα του ηλεκτρικού οξέος, όπως και η απόδοση των παραπροϊόντων.

#### 4.3.5.1. Ασυνεχής ζύμωση καθαρών σακχάρων με το βακτήριο *A. succinogenes*

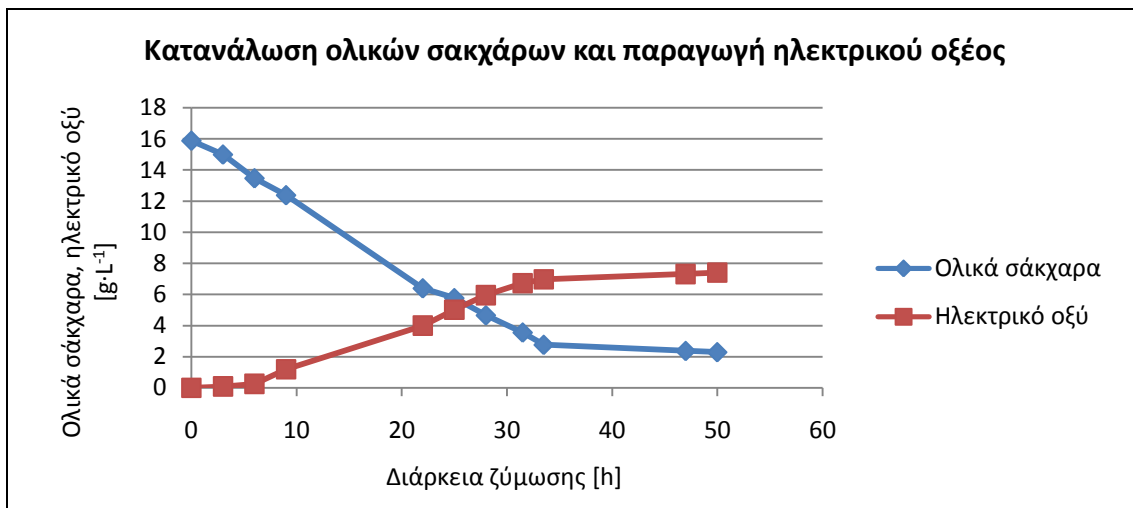
Οι τιμές του pH καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης με χρήση του βακτηρίου *A. succinogenes* φαίνονται στο γράφημα 4.36. Με την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος και των παραπροϊόντων, το pH μειώθηκε από την τιμή 7,1 που ήταν αρχικά στην τιμή 6,6.



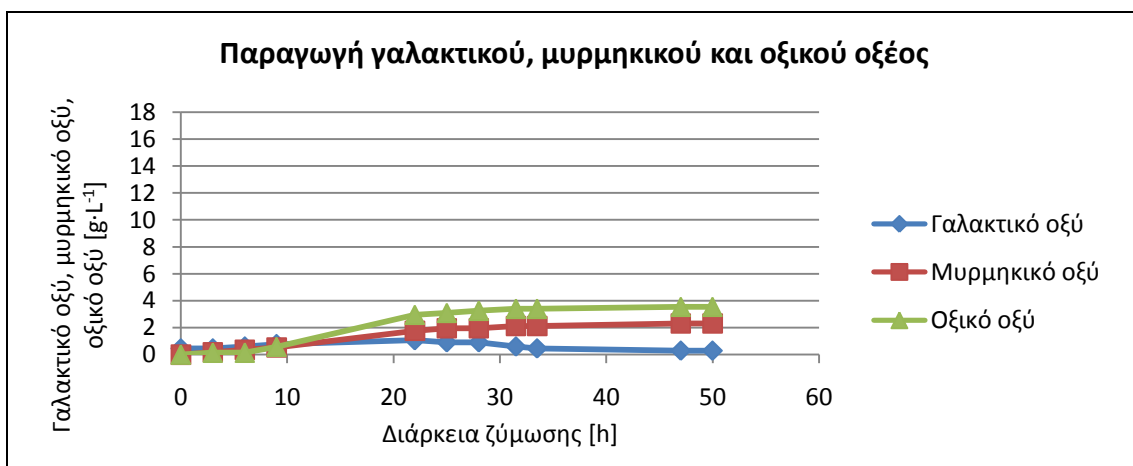
Γράφημα 4.36: Μέτρηση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Το γράφημα 4.37 δείχνει την πορεία της ζύμωσης ως προς την κατανάλωση των σακχάρων και την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 50 h. Συνολικά καταναλώθηκαν 13,6 g·L<sup>-1</sup> σακχάρων και παράχθηκαν 7,4 g·L<sup>-1</sup>

ηλεκτρικού οξέος με απόδοση  $0,54 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Η παραγωγικότητα της ζύμωσης στις 50 h ήταν  $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .



Γράφημα 4.37: Συγκέντρωση ολικών σακχάρων και ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης



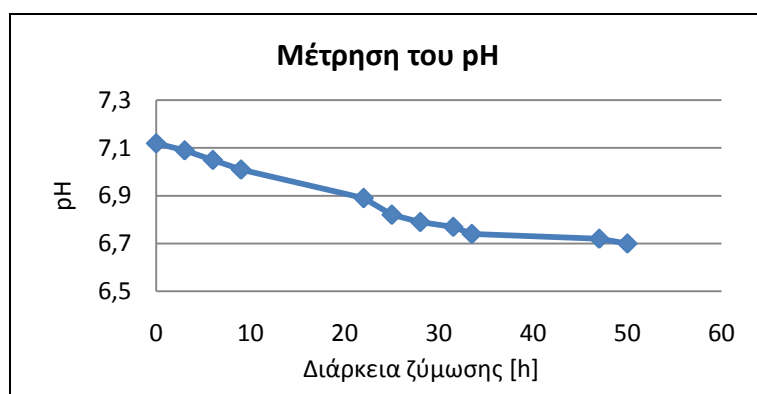
Γράφημα 4.38: Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Από τις συγκεντρώσεις των παραπροϊόντων το οξικό οξύ που παράχθηκε είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση,  $3,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (γράφημα 4.38). Παράχθηκαν  $2,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  μυρμηκικό οξύ, ενώ το γαλακτικό οξύ είχε αρχικά πολύ μικρή συγκέντρωση,  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , στη συνέχεια έφτασε την μέγιστη τιμή  $1,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  στις 22 h και μέχρι τις 50 h καταναλώθηκε σχεδόν όλη η ποσότητα αφού έμειναν μόνο  $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Οι αναλογίες παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς οξικό οξύ και προς μυρμηκικό οξύ ήταν 2,1:1 και

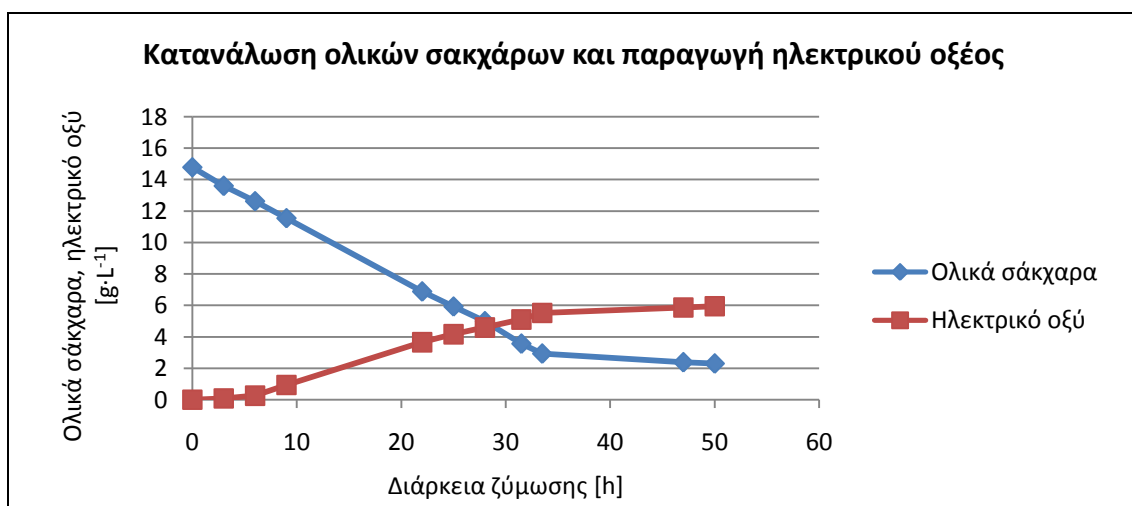
3,2:1, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτών των αναλογιών δείχνουν πως η ποσότητα των παραπροϊόντων είναι σημαντική, κυρίως του οξικού οξέος.

#### 4.3.5.2. Ασυνεχής ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα με προσθήκη γαλλικού οξέος 0,1 g·L<sup>-1</sup> με το βακτήριο *A. succinogenes*

Το γράφημα 4.39 δείχνει, επίσης, πως με την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος και των υπόλοιπων οξέων το pH μειώνεται από την τιμή 7,1 που ήταν αρχικά στην τιμή 6,7.

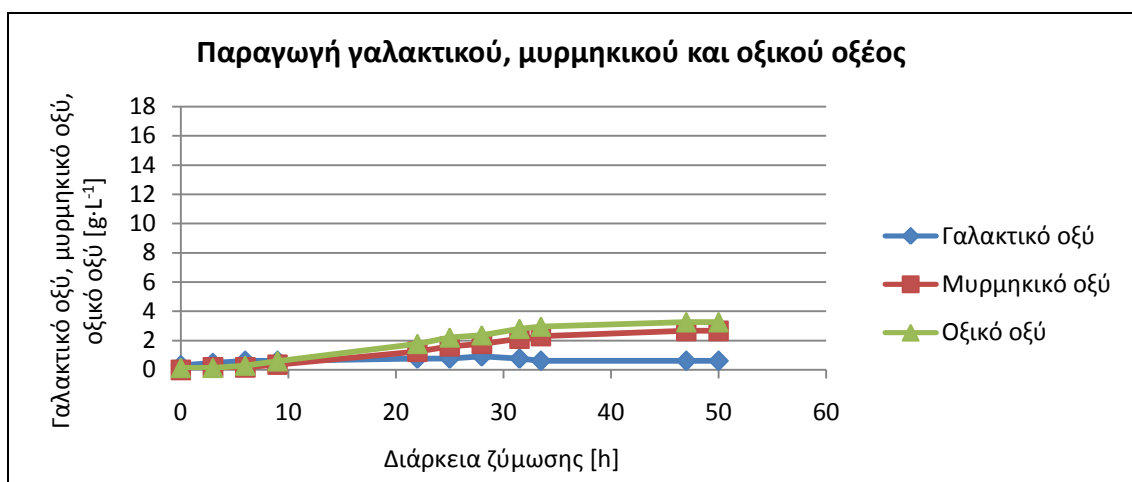


Γράφημα 4.39: Μέτρηση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης



Γράφημα 4.40: Συγκέντρωση ολικών σακχάρων και ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Συνολικά καταναλώθηκαν  $12,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σακχάρων στις 50 h και παράχθηκαν  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ηλεκτρικού οξέος με απόδοση  $0,48 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  (γράφημα 4.40). Η παραγωγικότητα της ζύμωσης στις 50 h ήταν  $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

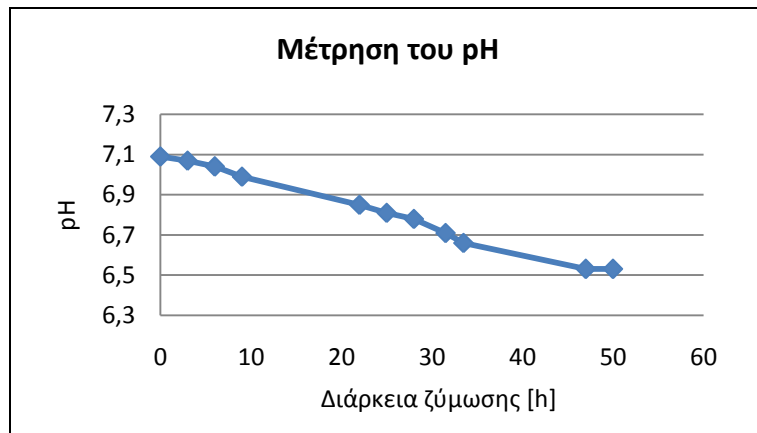


Γράφημα 4.41: Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

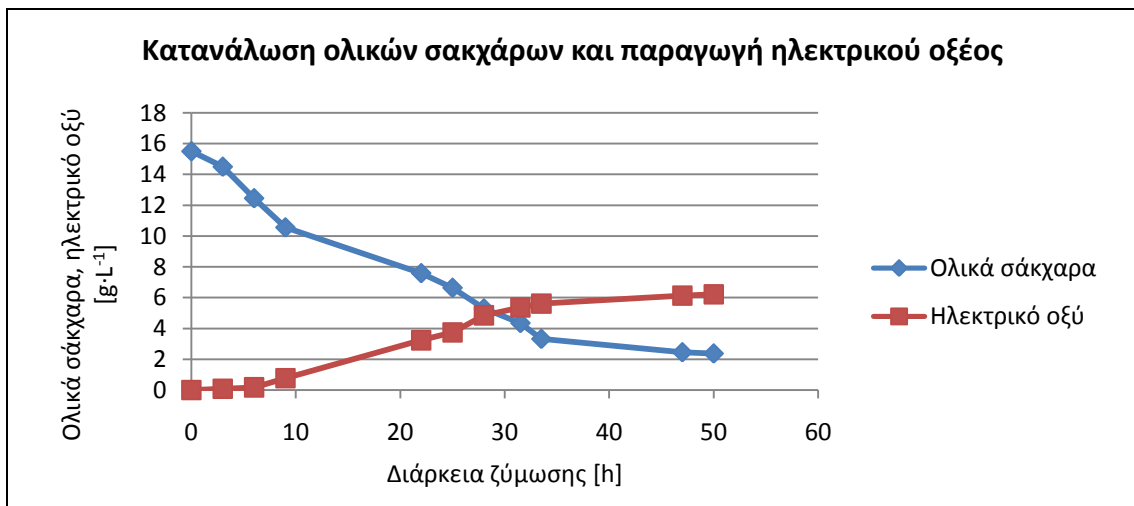
Στο γράφημα 4.41 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, με το παραχθέν οξικό οξύ να έχει και πάλι τη μεγαλύτερη συγκέντρωση,  $3,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , και αναλογία παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς οξικό οξύ 1,9:1. Παράχθηκε επίσης μυρμηκικό οξύ με συγκέντρωση  $2,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και γαλακτικό οξύ με συγκέντρωση  $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Οι αντίστοιχες αναλογίες ήταν 2,2:1 και 20:1.

4.3.5.3. Ασυνεχής ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα με προσθήκη γαλλικού οξέος  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  με το βακτήριο *A. succinogenes*

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αυτής φαίνεται πως το pH και πάλι μειώθηκε από 7,1 που ήταν αρχικά στην τιμή 6,5 (γράφημα 4.42).



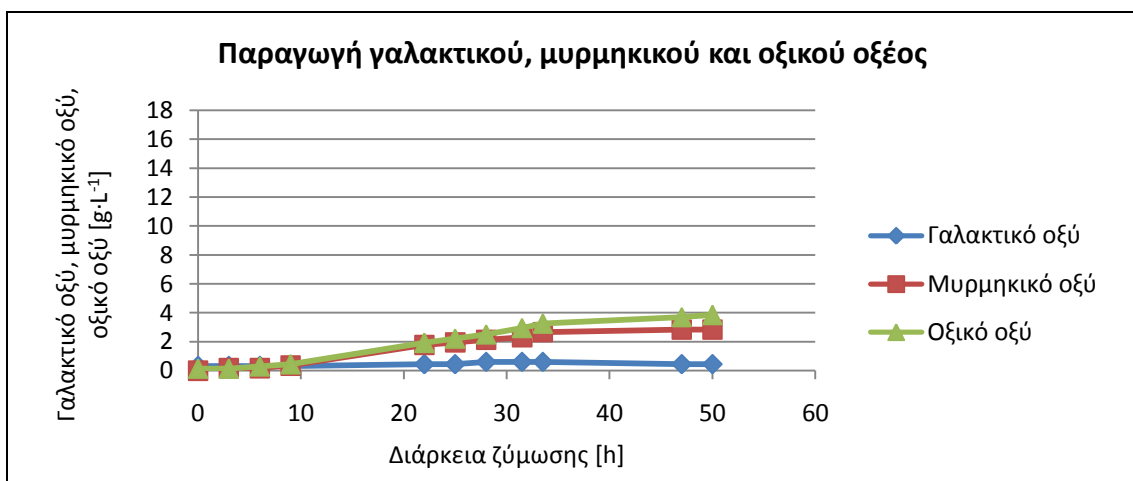
Γράφημα 4.42: Μέτρηση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης



Γράφημα 4.43: Συγκέντρωση ολικών σακχάρων και ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Τα συνολικά σάκχαρα που καταναλώθηκαν στις 50 h ήταν  $13,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και παράχθηκαν  $6,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ηλεκτρικού οξέος με απόδοση  $0,47 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  (γράφημα 4.43), η δε παραγωγικότητα της ζύμωσης ήταν  $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

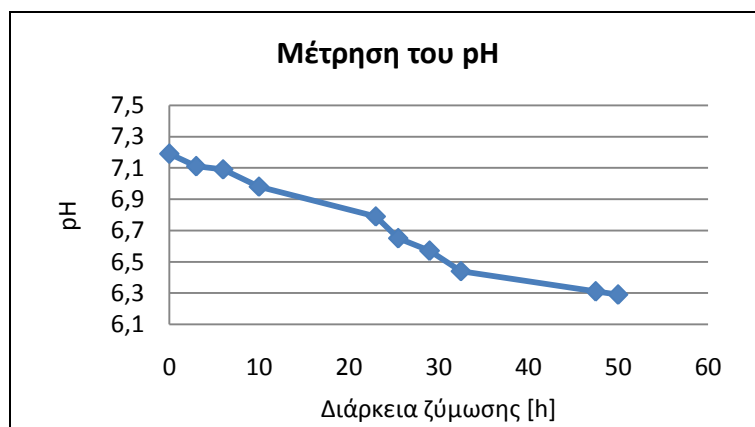
Από το γράφημα 4.44 προκύπτει ότι παράχθηκαν: οξικό οξύ με συγκέντρωση  $3,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , μυρμηκικό οξύ με συγκέντρωση  $2,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και γαλακτικό οξύ με συγκέντρωση  $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Οι αναλογίες παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς κάθε παραπροϊόν ήταν: 1,7:1 για το οξικό οξύ, 2,2:1 για το μυρμηκικό οξύ και 31:1 για το γαλακτικό οξύ. Από αυτές τις τιμές συμπεραίνεται ότι το οξικό και μυρμηκικό οξύ αποτελούν τα σημαντικά παραπροϊόντα της ζύμωσης.



Γράφημα 4.44: Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

#### 4.3.5.4. Ασυνεχής ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα με προσθήκη γαλλικού οξέος 1 g·L<sup>-1</sup> με το βακτήριο *A. succinogenes*

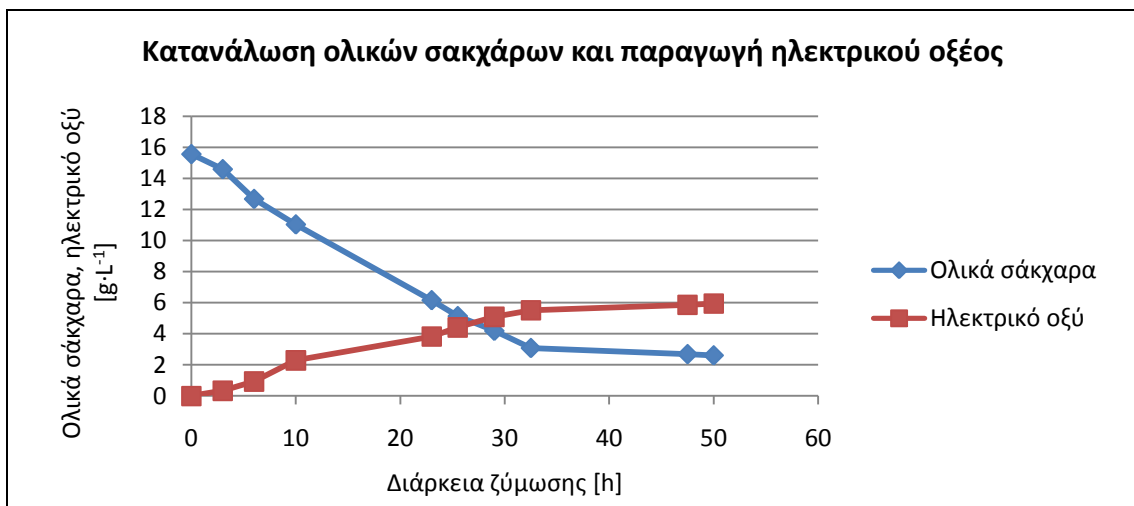
Το γράφημα 4.45 δείχνει πως το pH μειώθηκε στην τιμή 6,3 από την τιμή 7,2 που είχε αρχικά.



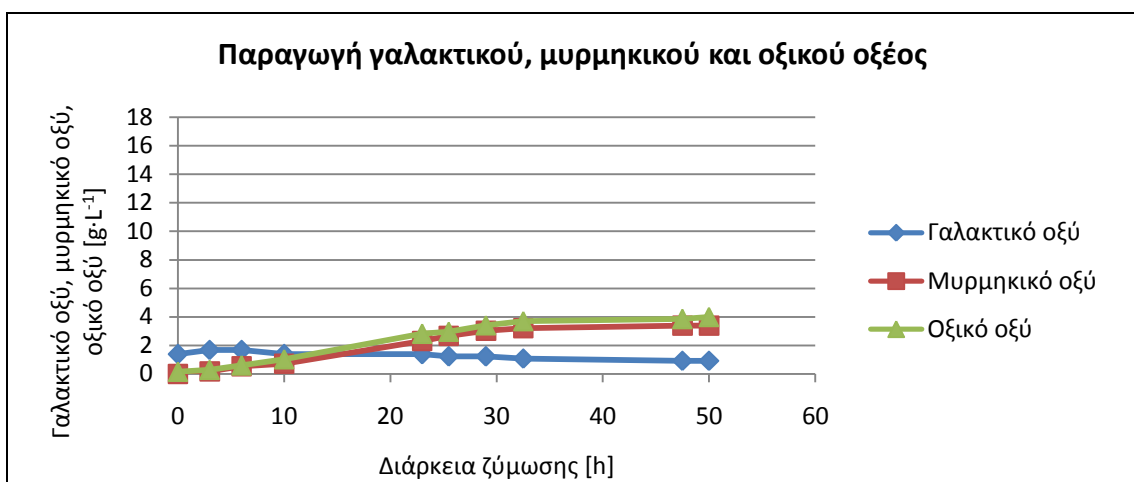
Γράφημα 4.45: Μέτρηση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Στο επόμενο γράφημα 4.46 φαίνεται πως συνολικά καταναλώθηκαν 13 g·L<sup>-1</sup> σακχάρων στις 50 h και παράχθηκαν 6 g·L<sup>-1</sup> ηλεκτρικού οξέος με απόδοση 0,46 g·g<sup>-1</sup>. Η παραγωγικότητα της ζύμωσης στις 50 h ήταν 0,12 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>.





*Γράφημα 4.46: Συγκέντρωση ολικών σακχάρων και ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης*

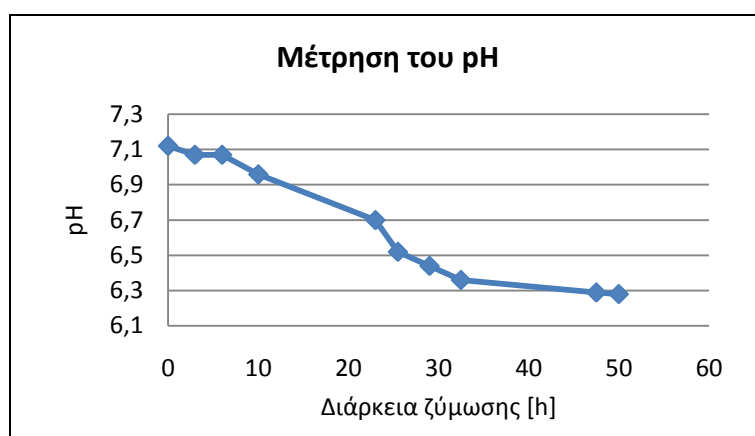


*Γράφημα 4.47: Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης*

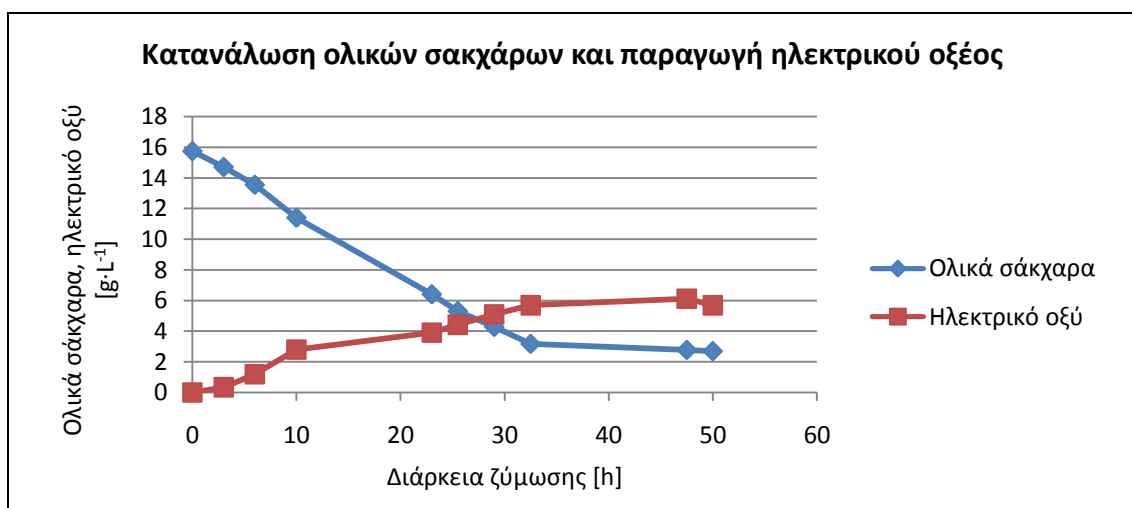
Τα παραπροϊόντα που παράχθηκαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης απεικονίζονται στο γράφημα 4.47, με το οξικό οξύ να έχει και πάλι τη μεγαλύτερη συγκέντρωση,  $3,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ενώ το μυρμηκικό οξύ είχε συγκέντρωση  $3,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Η αναλογία παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς οξικό οξύ και προς μυρμηκικό οξύ ήταν 1,6:1 και 1,8:1 αντίστοιχα. Το γαλακτικό οξύ είχε αρχικά μικρή συγκέντρωση,  $1,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , και στις 50 h έμειναν  $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Άρα καταναλώθηκαν  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 4.3.5.5. Ασυνεχής ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα με προσθήκη γαλλικού οξέος $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ με το βακτήριο *A. succinogenes*

Το pH επίσης μειώθηκε από την τιμή 7,1 που ήταν αρχικά σε 6,3 (γράφημα 4.48). Συνολικά καταναλώθηκαν  $13,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σακχάρων στις 50 h και παράχθηκαν  $5,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ηλεκτρικού οξέος με απόδοση  $0,44 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  και η παραγωγικότητα της ζύμωσης ήταν  $0,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (γράφημα 4.49).



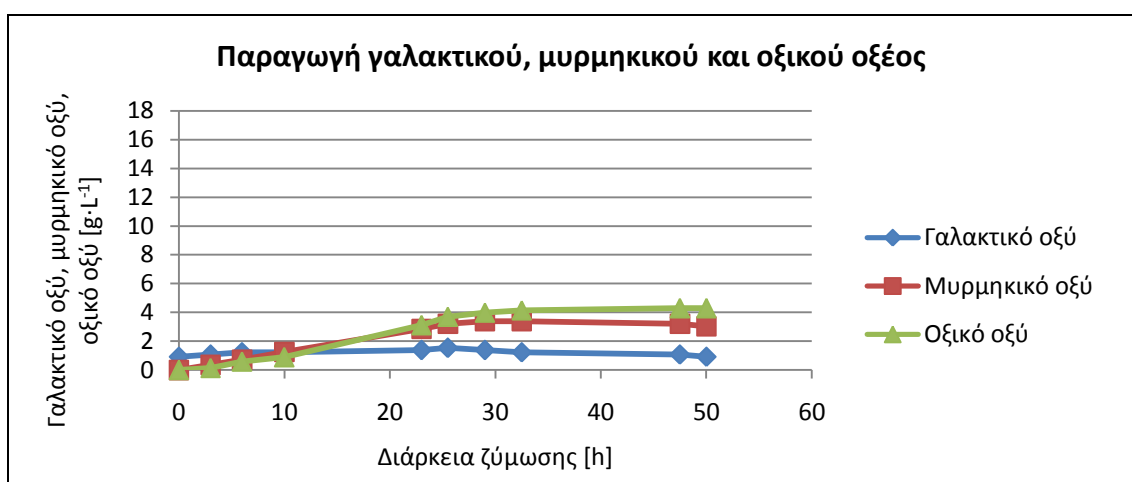
Γράφημα 4.48: Μέτρηση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης



Γράφημα 4.49: Συγκέντρωση ολικών σακχάρων και ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Όπως φαίνεται από το γράφημα 4.50 το οξικό οξύ που παράχθηκε είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση,  $4,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και αναλογία παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς

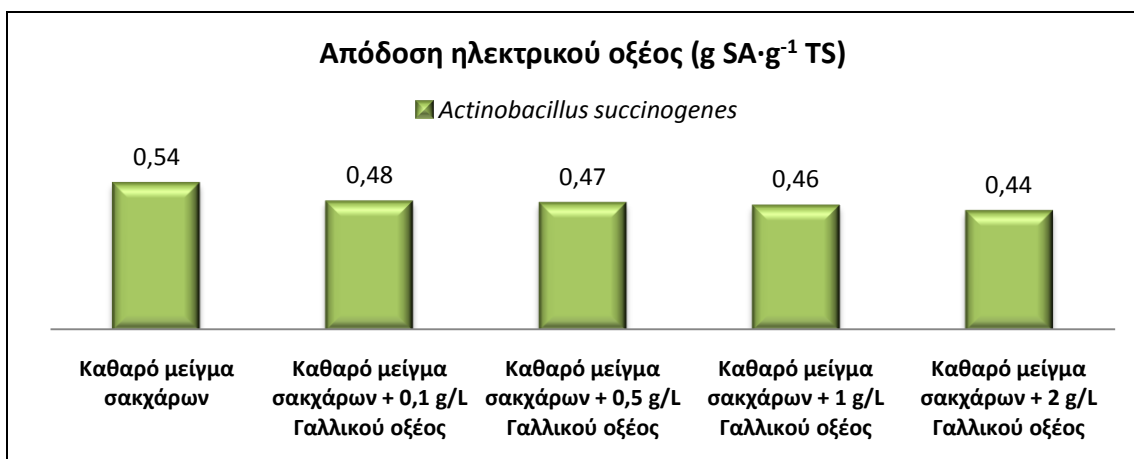
οξικό οξύ 1,3:1. Το παραχθέν μυρμηκικό οξύ στις 50 h είχε συγκέντρωση  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και αναλογία παραγωγής ηλεκτρικού οξέος προς μυρμηκικό 1,9:1. Το γαλακτικό οξύ παρουσίασε αρχικά μικρή συγκέντρωση,  $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , κατά τη διάρκεια της ζύμωσης έφτασε την μέγιστη τιμή  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  στις 25,5 h και μέχρι τις 50 h καταναλώθηκε η παραχθείσα ποσότητα.



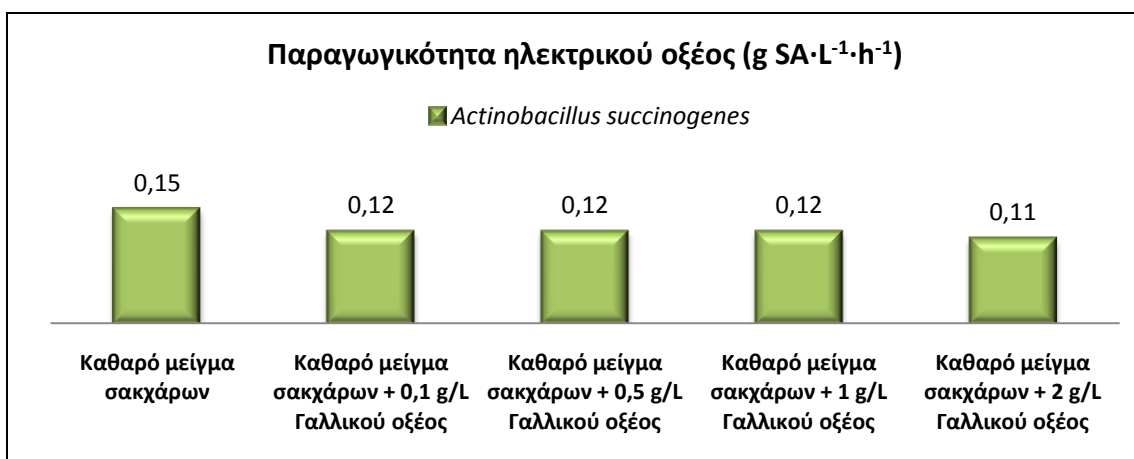
Γράφημα 4.50: Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

#### 4.3.6. Σύγκριση των αποτελεσμάτων των ζυμώσεων με θρεπτικό υπόστρωμα μίγμα καθαρών σακχάρων και προσθήκη γαλλικού οξέος

Από τα αποτελέσματα των ζυμώσεων σε μίγμα καθαρών σακχάρων και προσθήκης γαλλικού οξέος φαίνεται ότι ο *A. succinogenes* παρεμποδίζεται από την παρουσία του γαλλικού οξέος ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις. Οι τιμές απόδοσης παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος στα διαφορετικά υποστρώματα στις 50 h φαίνονται στο *γράφημα 4.51*, ενώ, το *γράφημα 4.52* παρουσιάζει τις τιμές της παραγωγικότητας του ηλεκτρικού οξέος στις 50 h.



Γράφημα 4.51: Σύγκριση απόδοσης παραγωγής ηλεκτρικού οξέος στις 50 h



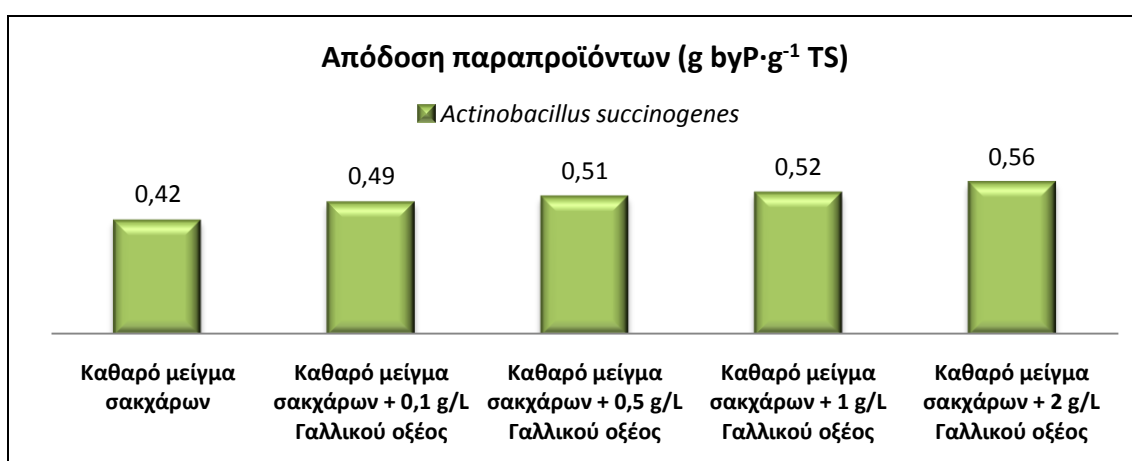
Γράφημα 4.52: Σύγκριση παραγωγικότητας ηλεκτρικού οξέος στις 50 h

Όταν χρησιμοποιήθηκε το καθαρό μίγμα των πέντε σακχάρων ως θρεπτικό υπόστρωμα, με όμοιες συγκεντρώσεις όπως και στο απόβλητο, η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος ήταν 0,54 g·g<sup>-1</sup> και η παραγωγικότητα ήταν 0,15 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. Ενώ, όταν προστέθηκε 0,1 g·L<sup>-1</sup> γαλλικού οξέος η απόδοση ήταν 0,48 g·g<sup>-1</sup> και η παραγωγικότητα 0,12 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. Η μείωση που υπέστη η τιμή της απόδοσης και της παραγωγικότητας του ηλεκτρικού οξέος ήταν 11,1% και 20%, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,5 g·L<sup>-1</sup> γαλλικού οξέος και παρατηρήθηκε μείωση 13% στην τιμή της απόδοσης του ηλεκτρικού οξέος και 12% στην τιμή της παραγωγικότητας σε σχέση με το θρεπτικό υπόστρωμα όπου δεν είχε πραγματοποιηθεί προσθήκη της παρεμποδιστικής ουσίας. Όταν προστέθηκε 1 g·L<sup>-1</sup> γαλλικού οξέος η απόδοση ήταν 0,46 g·g<sup>-1</sup> και η παραγωγικότητα 0,12 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, η αντίστοιχη μείωση, δηλαδή, ήταν 14,8% και 12%. Παρατηρείται, λοιπόν, πως μεταξύ

αυτών των τριών συγκεντρώσεων του γαλλικού οξέος δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές στις τιμές απόδοσης του ηλεκτρικού οξέος και η ποσοστιαία μείωση της παραγωγικότητας παρέμεινε στο 12% σε σχέση με την τιμή της παραγωγικότητας στο μέσο καλλιέργειας με το μίγμα καθαρών σακχάρων.

Στην περίπτωση όπου προστέθηκαν  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  γαλλικού οξέος η μείωση στις τιμές της απόδοσης και της παραγωγικότητας ήταν μεγαλύτερη. Η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος ήταν  $0,44 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  και η παραγωγικότητα  $0,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Παρατηρήθηκε μείωση 18,5% στην τιμή της απόδοσης του ηλεκτρικού οξέος και 26,7% στην τιμή της παραγωγικότητας συγκριτικά με το θρεπτικό μέσο που περιείχε μόνο το μίγμα των σακχάρων. Άρα φαίνεται πως το βακτήριο *A. succinogenes* παρεμποδίζεται αρκετά όταν η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος φτάνει τα  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .



Γράφημα 4.53: Σύγκριση απόδοσης παραγωγής παραπροϊόντων στις 50 h

Στη συνέχεια, το γράφημα 4.53 δείχνει τις τιμές αποδόσεως των παραπροϊόντων που παράγει ο μικροοργανισμός στα διαφορετικά υποστρώματα στις 50 h. Όταν χρησιμοποιήθηκε το καθαρό μίγμα σακχάρων η απόδοση των παραπροϊόντων ήταν  $0,42 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ενώ, όταν προστέθηκε  $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  γαλλικού οξέος η απόδοση αυξήθηκε σε  $0,49 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , κατά 16,7%. Προσθέτοντας  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  γαλλικού οξέος παρατηρήθηκε αύξηση 21,4% στην τιμή της απόδοσης των παραγόμενων οξέων, αφού η απόδοση των παραπροϊόντων έφτασε τα  $0,51 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Όταν προστέθηκε  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  γαλλικού οξέος δεν σημειώθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές. Η απόδοση ήταν  $0,52 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , η αντίστοιχη αύξηση, δηλαδή, ήταν 23,8%.

Στην περίπτωση όπου προστέθηκαν  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  γαλλικού οξέος παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της παραγωγής παραπροϊόντων. Η απόδοση στις 50 h ήταν  $0,56 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Παρατηρήθηκε αύξηση 33,3% στην απόδοση των παραπροϊόντων σε σχέση με το θρεπτικό υπόστρωμα όπου δεν έχει πραγματοποιηθεί προσθήκη της

παρεμποδιστικής ουσίας. Επομένως, η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος στο υπόστρωμα της ζύμωσης είναι άμεσα συνδεδεμένη με την παραγωγή παραπροϊόντων.

Φαίνεται, λοιπόν, πως το βακτήριο *A. succinogenes* παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές απόδοσης και παραγωγικότητας του ηλεκτρικού οξέος όταν η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος σταδιακά φτάνει τα  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , όπως και υψηλότερες τιμές απόδοσης των παραπροϊόντων. Αυτό το γεγονός δικαιολογεί το ποσοστό βελτίωσης του μικροοργανισμού ως προς την απόδοση και την παραγωγικότητα του ηλεκτρικού οξέος, όταν ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το εκχυλισμένο με οξικό αιθυλεστέρα απόβλητο, όπου και είχε αφαιρεθεί η μεγαλύτερη ποσότητα των φαινολικών συστατικών, σε σχέση με το μη επεξεργασμένο CSSL. Η παρεμπόδιση του *A. succinogenes* από τα φαινολικά συστατικά στην περίπτωση του αποβλήτου και από το γαλλικό οξύ στην περίπτωση των ζυμώσεων με τα καθαρά σάκχαρα ήταν εμφανής.

Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Borneman *et al.* (1986) για την επίδραση φαινολικών μονομερών σε βακτήρια της μεγάλης κοιλίας μηρυκαστικών διαπίστωσαν πως διαφορετικές συγκεντρώσεις και είδη φαινολικών ενώσεων επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τα διάφορα βακτήρια. Οι φαινολικές ενώσεις που χρησιμοποίησαν ήταν μεταξύ άλλων το συριγγικό και βανιλλικό οξύ, η βανιλίνη και η συριγγαλδεΐδη σε συγκεντρώσεις από  $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  μέχρι  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Οι συγκεντρώσεις αυτές που προστέθηκαν στα πειράματα αυτά ήταν υψηλότερες από εκείνες που έχουν βρεθεί στη μεγάλη κοιλία. Κυρίως οι ερευνητές αυτοί μελέτησαν την ανάπτυξη των βακτηρίων συγκριτικά με την αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών μονομερών και το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν ήταν ότι τα παράγωγα της υδροξυ-βενζαλδεΐδης (Barakat *et al.* 2012; Jung, 1985; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000-a; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000-b) βρέθηκαν να είναι ιδιαίτερα παρεμποδιστικά ως προς την μικροβιακή κυτταρική ανάπτυξη και τον μεταβολισμό, ενώ τα παράγωγα του υδροξυ-κινναμωμικού οξέος ήταν λιγότερο τοξικά. Επίσης, κανένα από τα χρησιμοποιούμενα παράγωγα των υδροξυ-βενζοϊκών οξέων δεν μείωσε σημαντικά την κατανάλωση των σακχάρων (Borneman *et al.* 1986).

Επιπλέον, στον πίνακα 4.4 φαίνεται από έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Garrote *et al.* (2004) η αντιμικροβιακή δράση ορισμένων φαινολικών ενώσεων, από αυτές που ήδη έχουν ταυτοποιηθεί ότι περιέχονται και στο CSSL, σε διάφορους μικροοργανισμούς παρέχοντας ως πληροφορία, όπου ήταν δυνατόν, την ελάχιστη συγκέντρωση του φαινολικού συστατικού που προκαλεί την παρεμπόδιση.

Πίνακας 4.4: Αντιμικροβιακή δράση φαινολικών ενώσεων που έχουν βρεθεί σε λιγνοκυτταρινούχα υλικά έπειτα από όξινη υδρόλυση (Garrote et al., 2004)

Φαινολική ένωση	Μικροοργανισμός (ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης, αν έχει ερευνηθεί)	Βιβλιογραφική αναφορά
Καφεϊκό οξύ	<i>Aspergillus flavus</i> (0,2 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>Aspergillus parasiticus</i> (0,2 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>Bacillus cereus</i> (0,35 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>Escherichia coli</i> (0,3 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>Klebsiella pneumoniae</i> (0,3 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>Salmonella typhimurium</i> (0,35 mg·L <sup>-1</sup> ); <i>Staphylococcus aureus</i> (0,4 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>Micrococcus luteus</i> ; <i>Proteus vulgaris</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Aziz et al. (1998); Chowdhury et al. (1996); Tunçel & Nergiz (1993)
Συρριγγικό οξύ	<i>A. flavus</i> (0,3 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>A. parasiticus</i> (0,3 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>E. coli</i> (0,4 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>K. pneumoniae</i> (0,4 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>S. aureus</i> (0,6 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>B. cereus</i> (0,4 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>S. typhimurium</i> (0,4 mg·L <sup>-1</sup> )	Aziz et al. (1998); Tunçel & Nergiz (1993)
Βανιλλικό οξύ	<i>A. flavus</i> (0,2 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>A. parasiticus</i> (0,2 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>B. cereus</i> (0,4 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>E. coli</i> (0,4 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>K. pneumoniae</i> (0,4 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>S. aureus</i> (0,55 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>S. typhimurium</i> (0,4 mg·mL <sup>-1</sup> ); <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Vibrio vulnificus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Aziz et al. (1998); Eun et al. (2000); Tunçel & Nergiz (1993)
Βανιλίνη	<i>A. flavus</i> (1,5 mg·L <sup>-1</sup> ); <i>Aspergillus niger</i> (1,5 mg·L <sup>-1</sup> ); <i>Aspergillus ochraceus</i> (1 mg·L <sup>-1</sup> ); <i>A. parasiticus</i> (1,5 mg·L <sup>-1</sup> ); <i>E. coli</i> ; <i>L. mesenteroides</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>V. vulnificus</i> ; <i>S. typhimurium</i>	López-Malo et al. (1998); Eun et al. (2000)

Ανάλογα με τον μικροοργανισμό και την ανοχή που επιδεικνύει σε παρεμποδιστικές ουσίες και τη φαινολική ένωση που χρησιμοποιείται κάθε φορά, η οποία χαρακτηρίζεται από ορισμένη αντιοξειδωτική ικανότητα, παρατηρούνται και διαφορετικές ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής των μικροοργανισμών. Για παράδειγμα,  $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  καφεϊκού οξέος για το βακτήριο *Escherichia coli*,  $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  συριγγικού οξέος για το βακτήριο *Salmonella typhimurium*,  $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  βανιλλικού οξέος για τον μύκητα *Aspergillus flavus* και  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  βανιλίνης για τον μύκητα *Aspergillus ochraceus*. Από τα πειράματα με το μίγμα καθαρών σακχάρων και την προσθήκη γαλλικού οξέος προκύπτει για τον *A. succinogenes* πως με την ελάχιστη ποσότητα  $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  γαλλικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε η απόδοση παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος παρεμποδίστηκε κατά 11,1% ενώ για την μέγιστη χρησιμοποιούμενη ποσότητα  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  γαλλικού οξέος κατά 18,5% συγκριτικά με την απόδοση παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος στη ζύμωση με τα καθαρά σάκχαρα.

Εν κατακλείδι, τα φαινολικά, όταν περιέχονται στο θρεπτικό μέσο ζύμωσης, επιδρούν αρνητικά στη λειτουργία της μικροβιακής κυτταρικής μεμβράνης και κατ' επέκταση και στη δραστηριότητα των μικροοργανισμών. Έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα να χάνεται η ακεραιότητα και να αυξάνεται η διαπερατότητά της (Cortez & Roberto, 2010; Zaldivar *et al.*, 1999). Επιπλέον, μεταβάλλουν τη μικροβιακή λιπιδική και τη φωσφολιπιδική σύσταση των κυτταρικών μεμβρανών και γενικότερα αναστέλλουν τη λειτουργία του συστήματος αντίστασης των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. Κατά συνέπεια, το κύτταρο αναλώνει την ενέργειά του για να συντηρηθεί και όχι για να παράξει προϊόντα, γεγονός που δικαιολογεί την αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών ενώσεων στη μικροβιακή κυτταρική ανάπτυξη και τον μεταβολισμό (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000-b).



## 5. Συμπεράσματα

Το απόβλητο CSSL περιέχει σημαντική ποσότητα σακχάρων ( $176,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) αλλά και φαινολικών ουσιών ( $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) και η ανάκτηση των τελευταίων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Οι υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων δρουν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών και συνιστάται η αφαίρεσή τους πριν το απόβλητο αυτό χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα σε ζυμώσεις. Άρα, ο στόχος που επιτεύχθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν η ταυτόχρονη αξιοποίηση του αποβλήτου CSSL ως πηγή φαινολικών συστατικών με αντιοξειδωτική ικανότητα και ως θρεπτικό μέσο για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω ζύμωσης με χρήση των βακτηρίων *Actinobacillus succinogenes* και *Basfia succiniciproducens*. Το πειραματικό μέρος της εργασίας χωρίστηκε σε δύο στάδια, το πρώτο αφορούσε την ανάκτηση και ανάλυση των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στο απόβλητο και το δεύτερο τη μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με θρεπτικό μέσο το προεπεξεργασμένο απόβλητο.

Σκοπός του πρώτου μέρους της πειραματικής διαδικασίας ήταν ο διαχωρισμός και ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών και η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, ενώ στο δεύτερο μέρος χρησιμοποιήθηκε το απόβλητο CSSL ως πηγή άνθρακα, και χωρίς, αλλά, και με προεπεξεργασία (μετά την αφαίρεση των φαινολικών συστατικών), για να μελετηθεί η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος με τη χρήση των βακτηρίων *A. succinogenes* και *B. succiniciproducens*. Στο δεύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν επίσης ζυμώσεις με το βακτήριο *A. succinogenes* σε μίγμα καθαρών σακχάρων, με όμοια συγκέντρωση με αυτή του αποβλήτου, και στη συνέχεια προστέθηκε γαλλικό οξύ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ώστε να μελετηθεί η παρεμπόδιση και να γίνει σύγκριση της παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος με τις προηγούμενες ζυμώσεις.

Κατά το διαχωρισμό των φαινολικών συστατικών με απλή εκχύλιση ενός σταδίου διαπιστώθηκε πως ο οξικός αιθυλεστέρας αποτελεί έναν αρκετά αποτελεσματικό οργανικό διαλύτη. Σε σύγκριση με το χλωροφόρμιο, τον διαιθυλαιθέρα, το τριχλωροαιθυλένιο και το βενζόλιο, το μεγαλύτερο ποσοστό, το 76% των φαινολικών ουσιών ανακτήθηκε από το απόβλητο με χρήση του οξικού αιθυλεστέρα. Με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών του αποβλήτου CSSL (με αραιώση 1:10) εκτιμήθηκε σε ισοδύναμα μάζας γαλλικού οξέος σε g προς όγκο αποβλήτου σε L ίση με  $9,08 \text{ g GAE}\cdot\text{L}^{-1}$ , μετά από απλή εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα με αναλογία όγκου αποβλήτου προς διαλύτη 1:3 v/v. Επιπλέον, αποδείχτηκε πως αυξάνοντας τα στάδια της εκχύλισης από ένα σε τρία ανακτάται σχεδόν όλη η ποσότητα των φαινολικών συστατικών με τον

οξικό αιθυλεστέρα και η αναλογία όγκου αποβλήτου προς διαλύτη 1:3 v/v θεωρείται αποτελεσματικότερη από την 1:2 v/v.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμήθηκε με τη μέθοδο DPPH• και βρέθηκε πως τα εκχυλίσματα από όλους τους διαλύτες, εκτός από αυτό του βενζολίου, χαρακτηρίζονται από πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δραστηριότητα, αφού  $AAI > 2$ . Συγκεκριμένα το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα, με αναλογία όγκου αποβλήτου προς διαλύτη 1:3 v/v, έχει την υψηλότερη τιμή  $AAI$  (6,88) σε σχέση με τις τιμές  $AAI$  των υπόλοιπων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Επίσης, σε σύγκριση με ισχυρά αντιοξειδωτικά αποδείχτηκε πως η τιμή του δείκτη  $AAI$  του εκχυλίσματος με οξικό αιθυλεστέρα είναι παραπλήσια με αυτή του trolox, μια συνθετική αντιοξειδωτική ουσία, παράγωγο της βιταμίνης E. Ακόμα, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δύο αυτών μεθόδων και ο συντελεστής συσχέτισης βρέθηκε ίσος με  $R=0,899$ . Η τιμή αυτή θεωρείται υψηλή και εξάγεται το συμπέρασμα πως το περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων που εκχυλίστηκε και προσδιορίστηκε η ποσότητά τους με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu αντιστοιχεί σε φαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτική ικανότητα σύμφωνα με τη μέθοδο DPPH•.

Στη συνέχεια, ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο HPLC-DAD δέκα φαινολικά συστατικά, από τα οποία τέσσερα είναι φαινολικά οξέα, δύο αλδεΐδες, μία ακετοφαινόνη, μία λιγνάνη μία ελλαγιταννίνη και ένα φλαβονοειδές. Αποδείχτηκε πως το ελλαγικό οξύ και το γαλλικό οξύ υπάρχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο απόβλητο CSSL,  $699,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  και  $622,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , αντίστοιχα, σε σχέση με το συριγγικό οξύ, τη λαρισιρεσινόλη, το βανιλικό οξύ, την ισορεματίνη, τη συριγγαλδεΐδη, τη βανιλίνη, την ακετοσυριγγόνη και το καφεϊκό οξύ. Ορισμένα από αυτά προέρχονται από τον αποπολυμερισμό της λιγνίνης μετά από όξινη υδρόλυση, ενώ άλλα, κυρίως τα μικρού μοριακού βάρους φαινολικά οξέα και αλδεΐδες, υπάρχουν ως φυσικά φαινολικά συστατικά στο δέντρο *E. globulus*.

Κατά τη διεξαγωγή των ζυμώσεων, παρατηρήθηκε πως και οι δύο μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν και παράγααν ηλεκτρικό οξύ σε όλα τα υποστρώματα παρουσιάζοντας, όμως, παρεμπόδιση από τις φαινολικές ουσίες όταν αυτές δεν είχαν αφαιρεθεί από το διάλυμα της ζύμωσης. Από τα αποτελέσματα των ζυμώσεων φαίνεται ότι το βακτήριο *B. succiniciproducens* ανταποκρίνεται καλύτερα στο υπόστρωμα αραιωμένου 1:10 CSSL αλλά και στο επεξεργασμένο CSSL, μετά την αφαίρεση των φαινολικών συστατικών, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη απόδοση παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και μικρότερη απόδοση παραγωγής παραπροϊόντων σε σχέση με το βακτήριο *A. succinogenes* στα ίδια υποστρώματα.

Για το βακτήριο *B. succiniciproducens* στην περίπτωση όπου αφαιρέθηκε το 76% των φαινολικών συστατικών, χρησιμοποιώντας οξικό αιθυλεστέρα ως διαλύτη, η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος αυξήθηκε κατά 16%, φτάνοντας την τιμή  $0,58 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,

με αύξηση της παραγωγικότητας κατά 25%, σε σχέση με το μη επεξεργασμένο απόβλητο. Ενώ, για το βακτήριο *A. succinogenes* η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος αυξήθηκε κατά 25,6%, φτάνοντας την τιμή  $0,49 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , και η παραγωγικότητα αυξήθηκε κατά 30%, σε σχέση με το μη επεξεργασμένο απόβλητο.

Από τις προαναφερθέντες τιμές φαίνεται πως το βακτήριο *A. succinogenes*, παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό βελτίωσης ως προς την απόδοση και την παραγωγικότητα του ηλεκτρικού οξέος, όταν ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιείται το εκχυλισμένο με οξικό αιθυλεστέρα απόβλητο σε σχέση με το μη επεξεργασμένο CSSL. Άρα, ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός παρεμποδίζεται περισσότερο από ότι το βακτήριο *B. succiniciproducens* από τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών που μπορεί να περιέχονται στο μέσο της ζύμωσης. Για αυτό το λόγο επιλέχτηκε το βακτήριο *A. succinogenes* και πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με θρεπτικό υπόστρωμα μίγμα καθαρών σακχάρων, με συγκέντρωση του κάθε σακχάρου όμοια με αυτή του αραιωμένου 1:10 CSSL, και προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος.

Από τα αποτελέσματα των ζυμώσεων σε μίγμα καθαρών σακχάρων φαίνεται ότι ο *A. succinogenes* παρεμποδίζεται σημαντικά από την παρουσία του γαλλικού οξέος όταν η συγκέντρωσή του φτάνει τα  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , αλλά ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις. Παρατηρήθηκε μείωση 18,5% στην απόδοση του ηλεκτρικού οξέος, 26,7% στην τιμή της παραγωγικότητας και αύξηση 33,3% στην τιμή της απόδοσης των παραπροϊόντων σε σχέση με το θρεπτικό υπόστρωμα όπου δεν είχε πραγματοποιηθεί προσθήκη του φαινολικού οξέος. Οι παραπάνω τιμές δικαιολογούν το ποσοστό βελτίωσης του μικροοργανισμού ως προς την απόδοση και την παραγωγικότητα του ηλεκτρικού οξέος, όταν ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιείται το εκχυλισμένο με οξικό αιθυλεστέρα απόβλητο.

Συνοψίζοντας, με την παρούσα μελέτη αποδείχτηκε πως το απόβλητο της βιομηχανίας χαρτοπολτού και χάρτου, CSSL, αποτελεί μία ανανεώσιμη πηγή άνθρακα που μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντων, όπως είναι τα φαινολικά συστατικά, αλλά και για την μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, μιας ένωσης που οδηγεί στην παραγωγή εύρους χημικών ουσιών που μπορούν να αντικαταστήσουν προϊόντα που παράγονται πετροχημικά.

## 6. Βιβλιογραφία

### 6.1. Ξένη βιβλιογραφία

- Aksoy, L., Kolay, E., Ağılönü, Y., Aslan, Z., and Kargioğlu, M. (2013). Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **20**, 235-239.
- Ani, V., Varadaraj, M. C., and Naidu, K. A. (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum L.*). *European Food Research and Technology*, **224**, 109-115.
- Asghar M. N., Khan S., and Mushtaq S. (2008). Management of treated pulp and paper mill effluent to achieve zero discharge. *Journal of Environmental Management*, **88**(4), 1285-1299.
- Ashorn, T., and Enkvist, T. (1962). Proofs for the Occurrence of Homoprotocatechuic Acid and some Other Pyrocatechol and Guaiacol Derivatives in Pressure Heated Cellulose Spent Liquors. *Acta Chemica Scandinavica*, **16**, 548-552.
- Aziz, N. H., Farag, S. E., Mousa, L. A., and Abo-Zaid, M. A. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, **93**, 43-54.
- Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**, 191-203.
- Baldwin, R. L., and Allison, M. J. (1983). Rumen Metabolism. *Journal of Animal Science*, **57**(2), 461-477.
- Barakat, A., Monlau, F., Steyer, J. P., and Carrere, H. (2012). Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresource Technology*, **104**, 90-99.
- Bechthold, I., Bretz, K., Kabasci, S., Kopitzky, R., and Springer, A. (2008). Succinic acid: A new platform chemical for biobased polymers from renewable resources. *Chemical Engineering & Technology* **31**, 647-654.
- Becker, J., Reinefeld, J., Stellmacher, R., Schäfer, R., Lange, A., Meyer, H., Lalk, M., Zelder, O., von Abendroth, G., Schröder, H., Haefner, S., and Wittmann, C. (2013). Systems-Wide Analysis and Engineering of Metabolic Pathway Fluxes in Bio-Succinate Producing *Basfia Succiniciproducens*. *Biotechnology and Bioengineering*, **110**, 3013-3023.
- Blainski, A., Lopes, G. C., and de Mello, J. C. P. (2013). Application and Analysis of the

- Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, **15**, 9308-9322.
- Borges, E. R., and Pereira, N. J. (2011). Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **38**, 1001-11.
- Borneman, W. S., Akin, D. E., and Vaneseltine, W. P. (1986). Effect of Phenolic Monomers on Ruminant Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **52**, 1331-1339.
- Bors, W., Kazacic, S.P., Michel, C., Kortenska, V. D., Stettmaier, K., Klasinc, L. (2002). Methoxyphenols-antioxidant principles in food plants and spices: Pulse radiolysis, EPR spectroscopy, and Density Functional Theory calculations. *International Journal Quantum Chemistry*, **90**, 969-979.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56**, 317-333.
- Burda, S., and Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2774-2779.
- Canadell, J. G., Le Quere, C., Raupach, M. R., Field, C. B., Buitenhuis, E. T., Ciais, P., Conway, T. J., Gillett, N. P., Houghton, R. A., and Marland, G. (2007). Contributions to accelerating atmospheric CO<sub>2</sub> growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(47), 18866-18870.
- Cao, G., Sofic, E., and Prior, R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 3426-3431.
- Carreira, P., Mendes, J. A. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., and Neto, C. P. (2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology*, **102**(15), 7354-7360.
- Cassidy, A., Hanley, B., and Lamuela-Raventos, R.M. (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **80**(7), 1044-1062.
- CEPI Key Statistics, (2012). European pulp and paper industry statistics. <http://www.cepi.org/topics/statistics>
- CEPI Key Statistics, (2013). European pulp and paper industry statistics. <http://www.cepi.org/topics/statistics>
- Cheng, K.-K., Zhao, X.-B., Zeng, J., and Zhang, J.-A. (2012). Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **6**, 302-318.
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought.

- American Journal of Clinical Nutrition*, **81**(1), 223S-229S.
- Chiusoli, G. P., and Maitlis, P. M. (2006). Metal-catalysis in Industrial Organic Processes. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, U.K.
- Chowdhury, B., Bhattacharyy, D., and Mukhopadhyay, S. (1996). Antimicrobial effect of some simple and complex phenolic compounds of olive fruits against pathogenic bacteria. *Biomedical Letters*, **54**, 45-49.
- Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., and Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, **91**, 107-110.
- Claude, J., and Ubbink, J. (2006). Thermal degradation of carbohydrate polymers in amorphous states: A physical study including colorimetry. *Food Chemistry*, **96**, 402-410.
- Conde, E., Cadahia, E., DiezBarra, R., and GarciaVallejo, M. C. (1996). Polyphenolic composition of bark extracts from *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*. *Holz Als Roh- Und Werkstoff*, **54**, 175-181.
- Conti, J. J., and Doman, L. E. (2013). U.S. Energy Information Administration (EIA), International Energy Outlook 2013, Independent Statistics and Analysis.
- Corona-Gonzalez, R. I., Bories, A., Gonzalez-Alvarez, V., and Pelayo-Ortiz, C. (2008). Kinetic study of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* ZT-130. *Process Biochemistry*, **43**, 1047-1053.
- Cortez, D. V., and Roberto, I. C. (2010). Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. *Bioresource Technology*, **101**, 1858-1865.
- Cruz, J. M., Dominguez, H., and Parajo, J. C. (2005). Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. *Food Chemistry*, **90**, 503-511.
- Cruz, J. M., Domínguez, J. M., Domínguez, H., and Parajó, J. C. (1999). Solvent extraction of hemicellulosic woodhydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. *Food Chemistry*, **67**, 147-153.
- Dabelstein, W., Reglitzky, A., Schütze, A., and Reders, K. (2007). Automotive Fuels. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Dai, J., and Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, **15**, 7313-7352.
- Davis, C. P., Cleven, D., Brown, J., and Balish, E. (1976). *Anaerobiospirillum*, a new genus of spiral-shaped bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **26**, 498-504.
- Dean, J. R. (2009). Extraction Techniques in Analytical Sciences, Chapter 2, 39-44,

*John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.*

- Delgenes, J. P., Moletta, R., and Navarro, J. M. (1996). Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **19**, 220-225.
- Dey, P.M. and Harborne, J.B., (1989). *Methods in Plant Biochemistry* (Vol. 1, Plant Phenolics), Academic Press.
- Elzaawely, A. A., Xuan, T. D., and Tawata, S. (2007). Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet*. *Food Chemistry*, **103**, 486–494.
- Eun, J.B., Lee, M.J. & Lee., J.C. (2000). Antimicrobial activities of rice hull lignins and their nitrobenzene-oxidized monomers. *American Chemistry Society*, **220<sup>th</sup>** (abstract paper, 58).
- European Commission, (2011). *Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC), Reference Document on Best Available Techniques in the Pulp and Paper Industry*.
- European Commission, (2013). *Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC), Best Available Techniques (BAT) Reference document for the production of pulp, paper and board*.
- Evtuguin, D. V., Neto, C. P., Silva, A. M., Domingues, P. M., Amado, F. M., Robert, D., and Faix, O. (2001). Comprehensive study on the chemical structure of dioxane lignin from plantation *Eucalyptus globulus* wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4252-61.
- Evtuguin, D. V., Xavier, A. M. R. B., Silva, C. M., and Prates A. (2010). Towards comprehensive utilization of side products from sulphite pulp production: A biorefinery approach. In: *Proceedings of the 21<sup>st</sup> national meeting at Lisbon, Portugal*.
- Faustino, H., Gil, N., Baptista, C., and Duarte, A. P. (2010). Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds Extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors. *Molecules*, **15**, 9308-9322.
- Fernandes, D. L. A., Silva, C. M., Xavier, A. M. R. B., Evtuguin D. V. (2012). Fractionation of sulphite spent liquor for biochemical processing using ion exchange resins. *Journal of Biotechnology*, **162**, 415-421.
- Finkel, T., and Holbrook N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **48**, 239-247.
- Frazer, F. R., and McCaskey, T. A. (1989). Wood Hydrolyzate Treatments for Improved Fermentation of Wood Sugars to 2,3-Butanediol. *Biomass*, **18**, 31-42.
- Frazer, F. R., and McCaskey, T. A. (1991). Effect of Components of Acid-Hydrolyzed

- Hardwood on Conversion of D-Xylose to 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **13**, 110-115.
- Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., and Nieto, C. P. (2002). Identification of new hydroxy fatty acids and ferulic acid esters in the wood of *Eucalyptus globulus*. *Holzforschung*, **56**, 143-149.
- Gallezot, P. (2012). Conversion of biomass to selected chemical products. *Chemical Society Reviews*, **41**, 1538-1558.
- Garrote, G., Cruz, J. M., Domínguez, H., and Parajó, J. C. (2003). Valorisation of waste fractions from autohydrolysis of selected lignocellulosic materials. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, **78**, 392-398.
- Garrote, G., Cruz, J. M., Moure, A., Domínguez, H., and Parajó, J. C. (2004). Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 191-200.
- Gascon, J., Valenciano, R., Tellez, C., Herguido, J., Menendez, M. (2006). A generalized kinetic model for the partial oxidation of n-butane to maleic anhydride under aerobic and anaerobic conditions. *Chemical Engineering Science*, **61**, 6385-6394.
- Glassner, D. A., and Datta, R. (1989). Process for the production and purification of succinic acid. U.S. Patent No 5143834.
- González, J., Cruz, J. M., Domínguez, H., Parajó J. C. (2004). Production of antioxidants from *Eucalyptus globulus* wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates. *Food Chemistry*, **84**, 243-251.
- Guettler, M. V., Jain, M. K. & Rumler, D. (1996-a). Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining the variants. U.S. Patent 5573931.
- Guettler, M. V., Jain, M. K. & Soni, B. K. (1996-b). Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. U.S. Patent 5504004.
- Guettler, M. V., Rumler, D., and Jain, M. K. (1999). *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International Journal of Systemic Bacteriology*, **49**, 207-216.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, **344**(8924), 721-724.
- Harborne, J. B. and Simmonds, N. W. (1964). *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, 101.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., and Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants, chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 572-584.



- Hepburn, A. J. (2011). The synthesis of succinic acid and its extraction from fermentation broth using a two-phase partitioning bioreactor. Master Thesis, Department of Chemical Engineering, Queen's University Kingston, Ontario, Canada.
- Hodge, D. B., Andersson, C., Berglund, K. A., and Rova, U. (2009). Detoxification requirements for bioconversion of softwood dilute acid hydrolyzates to succinic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, **44**, 309-316.
- Huh, Y. S., Jun, Y., Hong, Y. K., Song, H., Lee, S. Y., and Hong, W. H. (2006). Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. *Process Biochemistry*, **41**, 1461-1465.
- Isar, J., Agarwal, L., Saran, S., Gupta, P., Saxena, R. K. (2006). Effect of process parameters on succinic acid production in *Escherichia coli* W3110 and enzymes involved in the reductive tricarboxylic acid cycle. *Canadian Journal of Microbiology*, **52**(9), 893-902.
- Jung, H. G. (1985). Inhibition of structural carbohydrate fermentation by forage phenolics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **36**, 74-80.
- Kang, S. H., and Chang, Y. K. (2005). Removal of organic acid salts from simulated fermentation broth containing succinate by nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, **246**, 49-57.
- Karamać, M., Kosińska, A., Estrella, I., Hernández, T., and Dueñas, M. (2012). Antioxidant activity of phenolic compounds identified in sunflower seeds. *European Food Research and Technology*, **235**, 221-230.
- Kim, D. Y., Yim, S. C., Lee, P. C., Lee, W. G., Lee, S. Y., and Chang, H. N. (2004). Batch and continuous fermentation of succinic acid from wood hydrolysate by *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 648-653.
- Kim, S. J., Seo, S. O., Park, Y. C., Jin, Y. S., and Seo, J. H. (2014). Production of 2,3-butanediol from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* [Epub ahead of print].
- Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Garcia, I. L., Kookos, I. K., Papanikolaou, S., Kwan, T. H., and Lin, C. S. K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, **43**, 2587-2627.
- Kroh, L. W. (1994). Caramelisation in food and beverages. *Food Chemistry*, **51**, 373-379.
- Kuhnert, P., Scholten, E., Haefner, S., Mayor, D., and Frey, J. (2010). *Basfia succiniciproducens* gen. nov., sp nov., a new member of the family Pasteurellaceae isolated from bovine rumen. *International Journal of Systematic*

- and Evolutionary Microbiology*, **60**, 44-50.
- Langseth, L. (1993). From the Editor: Antioxidants and Diseases of the Brain Antioxidant Vitamin Newsletter. 4, 3.
- Lawford, H. G., and Rousseau, J. D. (1993). Production of ethanol from pulp-mill hardwood and softwood spent sulfite liquors by genetically-engineered *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **39**, 667-85.
- Lee, P. C., Lee, S. Y., Hong, S. H., and Chang, H. N. (2002). Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**, 663-668.
- Lee, P. C., Lee, W. G., Kwon, S., Lee, S. Y., and Chang, H. N. (1999). Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> supply and glucose concentration. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 549-554.
- Lee, S. Y., Kim, J. M., Song, H., Lee, W. G., Kim, T. Y., and Jang, Y. (2008). From genome sequence to integrated bioprocess for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **79**, 11-22.
- Li, X., Wu, X., and Huang, L. (2009). Correlation between Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Radix Angelicae Sinensis (Danggui). *Molecules*, **14**, 5349-5361.
- Lin, S. K. C., Du, C. Y., Koutinas, A., Wang, R. H., and Webb, C. (2008). Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal*, **41**, 128-135.
- Liu, Y. P., Zheng, P., Sun, Z. H., Ni, Y., Dong, J. J., and Wei, P. (2008-a). Strategies of pH control and glucose-fed batch fermentation for production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **83**, 722-729.
- Liu, Y. P., Zheng, P., Sun, Z. H., Ni, Y., Dong, J. J., and Zhu, L. L. (2008-b). Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, **99**, 1736-1742.
- Llano, T., Rueda, C., Quijorna, N., Blanco, A., and Coz, A. (2012). Study of the delignification of hardwood chips in a pulping process for sugar production. *Journal of Biotechnology*, **162**, 422-429.
- Lloyd, P. J. D. (2004). Principles of Industrial Solvent Extraction. Chapter 8. *Taylor & Francis Group, LLC*. Rondebosch, South Africa.
- López-Malo, A., Alzamora, S. M., and Argaiz, A. (1998). Effect of natural vanillin on germination time and radial growth on moulds in fruit-based agar systems. *Food*

- Microbiology*, **12**, 213–219.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, A., Rémésy, A., and Jimenez, L. (2004). Polyphenols, food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 727-747.
- Marques, A. P., Evtuguin, D. V., Magina, S., Amado, F. M. L., and Prates, A. (2009). Chemical Composition of Spent Liquors from Acidic Magnesium-Based Sulphite Pulping of *Eucalyptus globulus*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **29**, 322-336.
- McKinlay, J. B., and Vieille, C. (2008). <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis of *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism at different NaHCO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub> concentrations. *Metabolic Engineering*, **10**, 55-68.
- McKinlay, J. B., Laivenieks, M., Schindler, B. D., McKinlay, A. A., Siddaramappa, S., Challacombe, J. F., Lowry, S. R., Clum, A., Lapidus, A. L., Burkhart, K. B., Harkins, V., and Vieille, C. (2010). A genomic perspective on the potential of *Actinobacillus succinogenes* for industrial succinate production. *BMC Genomics*, **11**, 680.
- McKinlay, J. B., Shachar-Hill, Y., Zeikus, J. G., and Vieille, C., (2007-a). Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of <sup>13</sup>C-labeled metabolic product isotopomers. *Metabolic Engineering*, **9**, 177-192.
- McKinlay, J. B., Vieille, C., and Zeikus, J. G. (2007-b). Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **76**, 727-740.
- Mendes, C. V. T., Carvalho, M. G. V. S., Baptista, C. M. S. G., Rocha, J. M. S., Soares, B. I. G., and Sousa, G. D. A. (2009). Valorisation of hardwood hemicelluloses in the kraft pulping process by using an integrated biorefinery concept. *Food and Bioproducts Processing*, **87**, 197-207.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH•) for estimating antioxidant. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **26**(2), 211-219.
- Morris, P., and Robbins, M. (1997). Manipulating the chemical composition of plants, 12-13. In *Manipulating Plant Chemistry. Iger Innovations*.
- Natella, F., Nardini, M., De Felice, M., and Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants, Structure-activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1453-1459.
- National Fire Protection Association, NFPA 704, (2012 Edition), Standard System for the Identification of the Hazards of Materials for Emergency Response. Quincy, Massachusetts.
- Nenadis, N., Wang, L.F., Tsimidou, M., Zhang, H.Y. (2004). Estimation of scavenging

- activity of phenolic compounds using the ABTS<sup>•+</sup> assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 4669-4674.
- Olsson, L., and Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, **18**, 312-331.
- Ozcelik, O., Lee, J. H., and Min, D. B. (2003). Effects of light, oxygen and pH on the Absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, **68**, 487-490.
- Palmqvist, E., and Hahn-Hägerdal, B. (2000-a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, **74**, 17-24.
- Palmqvist, E., and Hahn-Hägerdal, B. (2000-b). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, **74**, 25-33.
- Parajo, J. C., Dominguez, H. and Dominguez, J. M. (1997). Xylitol production from *Eucalyptus* wood hydrolysates extracted with organic solvents. *Process Biochemistry*, **32**(7), 599-604.
- Parajó, J. C., Domínguez, H., Moure, A., Díaz-Reinoso, B., Conde, E., Luisa, M. S., Conde, M. J., and González-López N. (2008). Recovery of phenolic antioxidants released during hydrolytic treatments of agricultural and forest residues. *The Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **7**(8), 3243-3249.
- Parr, A.J., and Boldwell, G.P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 985-1012.
- Pateraki, C., Alexandri, M., Papapostolou, H., Vlysidis, A., Papanikolaou, S., and Koutinas, A. (2013). Valorization of By-Product Streams from the Pulp and Paper Industry for Succinic Acid Production. *Nanotech*, **3**(7), 616-619.
- Pereira, S. R., Portugal-Nunes, D. J., Evtugin, D. V., Serafim, L. S., Xavier, A. M. R. B. (2013). Advances in ethanol production from hardwood spent sulphite liquors. *Process Biochemistry*, **48**, 272-282.
- Pérez, J. A. M., and Aguilar, F. T. A. (2013). Chemistry of Natural Antioxidants and Studies Performed with Different Plants Collected in Mexico. Chapter 3 in *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*, Dr. Jose Antonio Morales-Gonzalez (Ed.), *InTech*, p. 68
- Perlack, R. D., Wright, L. L., Turnhollow, A. F., Graham, R. L., Stokes, B. J., and Erbach, D. C. (2005). Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply. p.59. Oak Ridge National Laboratory. Oak Ridge, Tennessee.
- Perry, R. H., Green, D. W., and Maloney, J. O. (1997). Perry's Chemical Engineers

- Handbook. *The McGraw Hill Companies*, 7<sup>th</sup> edition.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). Introduction In Antioxidants in food. Chapter 1, pp. 1-3. *Woodhead Pbs. Ltd.* Cambridge, UK.
- Prior, R. L., Wu, X. L. and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(10), 4290-4302.
- Ratty, A. K., and Das, N. P. (1988). Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: structure activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, **39**, 69-79.
- Restolho, J. A., Prates, A., de Pinho, M. N., and Afonso, M. D. (2009). Sugars and lignosulphonates recovery from eucalyptus spent sulphite liquor by membrane processes. *Biomass and Bioenergy*, **33**, 1558-1566.
- Ribéreau-Gayon, P. (1972). Plant Phenolics, *Oliver and Boyd*, Edinburgh, pp. 254.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubourdieu, Q. (2007). Handbook of enology, **2**, *Wiley Publications*.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoid and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**, 933-956.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, **2**(4), 152-159.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 2866-2887.
- Roberfroid, M., and Calderon, P. (1990). Free Radicals and Oxidation: Phenomena in Biological System, Chapter 1, p. 17-19, *Marcel Dekker*, New York.
- Roberts, J. C. (1996). The Chemistry of Paper. *The Royal Society of Chemistry-RSC Paperbacks*, p.1-2, London, U.K.
- Roginsky, V., and Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, **92**, 235-254.
- Romani, A, Mulinacci, N, Pinelli, P, Vincieri, F. F., Cimato, A. (1999). Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 964-967.
- Routray, W., and Orsat, V. (2013). Preparative Extraction and Separation of Phenolic Compounds. *K.G. Ramawat, J.M. Mérillon (eds.)*, Natural Products, p. 2013-2045, Canada.
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., and Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities, phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, **177**, 67-80.
- Samuelov, N. S., Lamed, R., Lowe, S., and Zeikus, J. G. (1991). Influence of CO<sub>2</sub>-

- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Levels and pH on Growth, Succinate Production, and Enzyme Activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 3013-3019.
- Santos, S. A. O., Villaverde, J. J., Silva, C. M., Neto, C. P., and Silvestre, A. J. D. (2012). Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* Labill bark. *Journal of Supercritical Fluids*, **71**, 71-79.
- Santos, S. G., Marques, A. P., Lima, D. L. D., Evtuguin, D. V., and Esteves, V. I. (2011). Kinetics of Eucalypt Lignosulfonate Oxidation to Aromatic Aldehydes by Oxygen in Alkaline Medium. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **50**, 291-298.
- Scalbert, A. and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, **130**, 2073-2085.
- Scherer, R., and Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, **112**, 654-658.
- Scholten, E. and Dägele, D. (2008). Succinic acid production by a newly isolated bacterium. *Biotechnology Letters*, **30**, 2143-2146.
- Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, **44**(3), 158-163.
- Shahidi, F., and Wanasundara, J. P. D. (1992). Phenolic Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**, 67-103.
- Sidiras, D. and Koukios, E. (2004). Simulation of acid-catalysed organosolv fractionation of wheat straw. *Bioresource technology*, **94**(1), 91-98.
- Silva, M. M., Santos, M. R., Caroco, G., Rocha, R., Justino, G., and Mira, L. (2002). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids, A re-examination. *Free Radical Research*, **36**, 1219-1227.
- Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H. A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., and Sahin, F. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, **15**, 627-634.
- Song, H, Lee, J. W., Choi, S., You, J. K., Hong, W. H., and Lee, S. Y. (2007). Effects of dissolved CO<sub>2</sub> levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production. *Biotechnology and Bioengineering*, **98**, 1296-1304.
- Song, H., and Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 352-361.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., and Hall, S. J. (1995). Principles of Fermentation Technology. (2<sup>nd</sup> Edition), *Buttermorth Heinemann, Elsevier Ltd*, Chapter **4**, p. 93-122. University of Hertfordshire, Hatfield, UK
- Sun, Y., and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol

- production: a review. *Bioresource Technology*, **83**, 1-11.
- Swain, T., and Bate-Smith, E. C. (1962). Flavonoid compounds, in: *Comparative Biochemistry*, **3**, M. Florkin and H. S. Mason, eds., *Academic Press*, p. 755-809. New York, NY.
- Tapiero, H., Tew, K.D., Bu, N., and Mathe, G. (2000). Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **56**(4), 200-207.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., and Sokmen, A. (2005). In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chemistry*, **90**, 685-689.
- Tunçel, G., and Nergiz, C. (1993). Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology*, **17**, 300-302.
- Urbance, S. E., Pometto, A. L., Di Spirito, A. A., and Demirci, A. (2003). Medium Evaluation and Plastic Composite Support Ingredient Selection for Biofilm Formation and Succinic Acid Production by *Actinobacillus Succinogenes*. *Food Biotechnology*, **17**, 53-65.
- Urquiaga, I., and Leighton, F. (2000). Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological Research*, **33**(2), 55-64.
- Van der Werf, M. J., Guettler, M. V., Jain, M. K., and Zeikus, J. G. (1997). Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Archives of Microbiology*, **167**, 332-42.
- Vaya, J. Mahmood, S., Goldblum, A., Aviram, M., Volkova, N., Shaalan, A., Musa, R., and Tamir, S. (2003). Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. *Phytochemistry*, **62**, 89-99.
- Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M. S., González-Alvarez, J., and Antorrena, G. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, **28**, 279-285.
- Ventura, J., Belmares, R., Aguilera-Carbo, A., Gutiérrez-Sánchez, G., Rodríguez-Herrera, R., and Aguilar, C. N. (2008). Fungal Biodegradation of Tannins from Creosote Bush (*Larrea tridentata*) and Tar Bush (*Flourensia cernua*) for Gallic and Ellagic Acid Production. *Food Technology and Biotechnology*, **46**(2), 213-217.
- Vermerris, W., and Nicholson, R. (2008). Phenolic Compound Biochemistry. *Springer Science*.
- Villarreal, M. L. M., Prata, A. M. R., Felipe, M. G. A., Silva, J. (2006). Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 17-24.

- Wan, C. X., Li, Y. B., Shahbazi, A., and Xiu, S. N. (2008). Succinic acid production from cheese whey using *Actinobacillus succinogenes* 130 z. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **145**, 111-119.
- Waterhouse, A. L. (2002). Current Protocols in Food and Analytical Chemistry. Determination of Total Phenolics. *John Wiley & Sons, Inc.*
- Werpy, T, and Petersen, G. (2004). Top Value Added Chemicals from Biomass Vol. I- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. *U.S. Department of Energy*. Office of the Biomass Program, Pacific Northwest National Laboratory, *National Renewable Energy Laboratory* (U.S.).
- Xavier, A. M. R. B., Correia, M. F., Pereira, S. R., and Evtuguin, D. V. (2010). Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor. *Bioresource Technology*, **101**, 2755-2761.
- Xi, Y. I., Dai, W. Y., Xu, R., Zhang, J. H., Chen, K. Q., Jiang, M., Wei, P., and Ouyang, P. K. (2013). Ultrasonic pretreatment and acid hydrolysis of sugarcane bagasse for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **36**, 1779-1785.
- Zaldivar, J., Martinez, A., and Ingram, L. O. (1999). Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, **65**, 24-33.
- Zeikus, J. G., Jain, M. K., and Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 545-552.



## 6.2. Ελληνική βιβλιογραφία

- Βαμβακάκη, Μ. (2003). Εργαστήρια Γενικής Χημείας Ι. *Σημειώσεις Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών*, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο.
- Ευσταθίου, Κ. Η. (2014). Κατάταξη προβλημάτων τα οποία συναντώνται στην ελληνική χημική ονοματολογία και ορολογία. *Παρουσίαση στο 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ονοματολογίας & Ορολογίας της Χημείας*, Ένωση Ελλήνων Χημικών, Αθήνα. [http://www.chem.uoa.gr/scinews/Reports/Rep\\_prob1\\_orologias.htm](http://www.chem.uoa.gr/scinews/Reports/Rep_prob1_orologias.htm)
- Κουμπής, Α., Λυκάκης, Ι., και Ρήγας, Δ. (2012). Εργαστηριακές Ασκήσεις Οργανικής Χημείας Ι. *Σημειώσεις του Τμήματος Χημείας*, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.
- Μπακέας, Ε., και Ευσταθίου, Κ. (2008). Εισαγωγή στους Αναλυτικούς Διαχωρισμούς. *Συμπληρωματικές σημειώσεις για το μάθημα Ενόργανη Ανάλυση Ι του Τμήματος Χημείας*, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Ορδούδη, Σ. Α. (2007). Φαινολικά οξέα ως φυσικοί παρεμποδιστές οξειδωσης-Αξιολόγηση δραστηριότητας, Προοπτική αξιοποίησης σε λειτουργικά τρόφιμα. *Διδακτορική Διατριβή*. Τμήμα Χημείας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.
- Σίσκος, Π. Α., και Νικολέλης, Δ. Π. (2005). Αναλυτικές Μέθοδοι Διαχωρισμού. *Τμήμα Χημείας*, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Ταραντίλης, Π., και Πολυσίου, Μ. (2008). Ενόργανη ανάλυση. *Πανεπιστημιακές σημειώσεις*, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Φιλιππακοπούλου, Θ. (2009) e-book: Ο κύκλος του χαρτιού, Αθήνα. <https://sites.google.com/site/paperfil/>