



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &  
ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

---

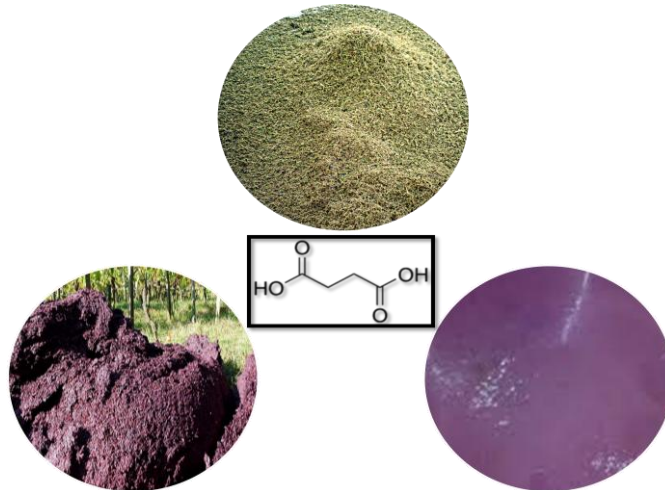
**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**

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

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Αξιοποίηση αποβλήτων οινοποιείου προς παραγωγή  
ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων*



**ΓΕΩΡΓΑΚΑ ΝΕΦΕΛΗ ΜΑΡΙΑ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2015

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*Αξιοποίηση αποβλήτων οινοποιείου προς παραγωγή  
ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων*

**ΓΕΩΡΓΑΚΑ ΝΕΦΕΛΗ ΜΑΡΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣ**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή: Απόστολος Κουτίνας  
Σεραφείμ Παπανικολάου  
Αθανάσιος Μαλλούχος

**ΑΘΗΝΑ 2015**

*Στη μητέρα μου Μαριάννα &*

*αδερφή μου Μαλβίνα*

“Χρέος έχεις και μπορείς στο δικό σου τον τομέα να γίνεις ήρωας.  
Αγάπα τον κίνδυνο. Τι είναι το πιο δύσκολο; Αυτό θέλω!  
Ποιό δρόμο να πάρεις; Τον πιο κακοτράχαλον ανήφορο.  
Αυτόν παίρνω κι εγώ, ακλούθα μου!  
Να μάθεις να υπακούς. Μονάχα όποιος υπακούει σε  
ανώτερό του ρυθμό είναι λεύτερος.  
Να μάθεις να προστάζεις. Μονάχα όποιος μπορεί να προστάζει  
είναι αντιπρόσωπός μου απάνω στη γης ετούτη.  
Ν' αγαπάς την ευθύνη. Να λες: Εγώ, εγώ μονάχος μου έχω  
χρέος να σώσω τη γης. Αν δε σωθεί, εγώ φταίω.  
Ν' αγαπάς τον καθένα ανάλογα με τη συνεισφορά του στον  
αγώνα. Μη ζητάς φίλους, να ζητάς συντρόφους!  
Να 'σαι ανήσυχος, αφχαρίστητος, απροσάρμοστος πάντα.  
Όταν μια συνήθεια καταντήσει βολική να τη συντρίβεις.  
Η μεγαλύτερη αμαρτία είναι η ευχαρίστηση.  
Που πάμε; Θα νικήσουμε ποτέ; Προς τι όλη τούτη η μάχη;  
Σώπα! Οι πολεμιστές ποτέ δε ρωτούνε!”

Ασκητική- Νίκος Καζαντζάκης

## **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 Βιοδιωλιστήρια» στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, Επίκουρο Καθηγητή Κουτίνα Απόστολο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και για την συνεχή υποστήριξη του στις προσπάθειές μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή Παπανικολάου Σεραφείμ και τον Λέκτορα Μαλλούχο Αθανάσιο για την ανάθεση της παρούσας εργασίας καθώς και για τις εξαιρετικές συμβουλές τους που εξέλαβα στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Αυγή Γαρδέλη για την πολύτιμη καθοδήγηση της. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους διδάκτορες, υποψήφιους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές των εργαστηρίων «Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων» και «Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για το εξαιρετικό εργασιακό περιβάλλον. Έχω την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την Μαίρη Αλεξανδρή, υποψήφια διδάκτορα, για την άψογη συνεργασία μας, την αμέριστη συμπαράσταση της και την συνεχή μετάδοση γνώσεων, καθώς επίσης και τον Δρ. Χαρίλαο Παπαποστόλου για την ανεκτίμητη συνεισφορά του καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου μελέτης. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστιές μου και την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την ανιδιοτελή υποστήριξη τους με τον δικό τους μοναδικό τρόπο και στον Δημήτρη για την υπομονή του και την ενθάρρυνσή του όλο αυτό το διάστημα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα οινοποιεία αποτελούν ένα σημαντικό τομέα της βιομηχανίας και το σταφύλι είναι ένα σημαντικό αγαθό το οποίο παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Κάθε χρόνο παγκοσμίως παράγονται 210 εκατομμύρια τόνοι σταφυλιών, εκ των οποίων το 15% καταλήγουν για οινοποίηση. Τα παραπροϊόντα που προκύπτουν από την οινοποίηση είναι οι βόστρυχοι, τα στέμφυλα, τα γίγαρτα και η οινολάσπη. Στην Ευρώπη, ετησίως συλλέγονται 14,5 εκατομμύρια τόνοι αποβλήτων από οινοποιεία (Teixeira et al., 2014). Η αξιοποίηση αυτών των αποβλήτων προς παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας θα ευνοήσει τη μείωση του περιβαλλοντικού αντίκτυπου και θα αποφέρει βιώσιμα οικονομικά οφέλη στις τοπικές κοινωνίες (Lanchman et al., 2013).

Αρχικά, προσδιορίστηκε η ακριβής σύσταση των αποβλήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια σειρά φυσικοχημικών αναλύσεων και προσδιορίστηκε η περιεκτικότητά τους σε λιγνίνη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιπαρές ύλες, τέφρα, πρωτεΐνες, πηκτίνη και φαινολικές ενώσεις. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων δείχνουν ότι οι βόστρυχοι, τα στέμφυλα και τα γίγαρτα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (π.χ. αντιοξειδωτικά). Περιέχουν, επίσης, υψηλές ποσότητες κυτταρίνης και ημικυτταρίνης που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή σακχάρων, τα οποία στη συνέχεια θα μπορούσαν να αποτελέσουν πηγές άνθρακα για τη μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Το ηλεκτρικό οξύ είναι ένα δικαρβοξυλικό οξύ με τέσσερα άτομα άνθρακα και αποτελεί πρόδρομη ένωση για την σύνθεση βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, χημικών ουσιών, φαρμακευτικών προϊόντων αλλά και ως πρόσθετο στην βιομηχανία παραγωγής τροφίμων.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων οινοποιείου, ποικιλίας Αγιωργίτικου. Μια σειρά χημικών και βιολογικών διεργασιών, έλαβε χώρα με σκοπό να προκύψουν υδρολύματα πλούσια σε σάκχαρα. Η προεπεξεργασία των βοστρύχων, στεμφύλων και γιγάρτων βασίζεται σε αλκαλική υδρόλυση για την απομάκρυνση της λιγνίνης, που ακολουθείται από όξινη υδρόλυση για την αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης και

τελικά την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης. Η χημική υδρόλυση της ημικυτταρίνης πραγματοποιήθηκε με χρήση θειικού οξέος σε αυτόκαυστο (121°C) ενώ η βιομετατροπή της κυτταρίνης έγινε με χρήση κυτταρινασών. Οι υδρολύσεις οδηγούν στην παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων που μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων. Η αξιοποίηση της οινολάσπης περιλαμβάνει τον διαχωρισμό της αιθανόλης, των φαινολικών ενώσεων και του τρυγικού οξέος ώστε να επακολουθήσει η ενζυμική υδρόλυση του υπόλοιπου στερεού υπολείμματος, προκειμένου να παραχθεί ένα υπόστρωμα πλούσιο σε διάφορα θρεπτικά συστατικά τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο θρεπτικό μέσο ζύμωσης.

Χρησιμοποιώντας το υδρόλυμα ημικυτταρίνης ως πηγή άνθρακα και το υδρόλυμα οινολάσπης κυρίως ως πηγή αζώτου πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με το βακτήριο *Actinobacillus succinogenes* 130Z προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Ο μικροοργανισμός κατάφερε να αναπτυχθεί στα υδρολύματα και να καταναλώσει τα σάκχαρα παράγοντας πάνω από 7 g/L ηλεκτρικό οξύ από ένα υπόστρωμα αποτελούμενο εξ' ολοκλήρου από απόβλητα οينوποιείου. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι τα απόβλητα οينوποιείου θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν πλήρως ώστε το συμβατικό οينوποιείο να μετατραπεί σε ένα σύγχρονο βιοδιυλιστήριο.

Λέξεις κλειδιά: βόστρυχοι, στέμφυλα-γίγαρτα, οινολάσπη, *Actinobacillus succinogenes*, ηλεκτρικό οξύ.

## **ABSTRACT**

Wineries constitute an important industrial sector and grape is considered an important agricultural product, which is produced in large quantities. Each year 210 million t of grapes are produced worldwide, of which 15% are used for winemaking. The by-product streams produced during wine production are grape stalks, grape pomace (skin and seeds) and lees. In Europe, 14.5 million t of by-products are annually collected from wineries (Teixeira et al., 2014). The valorisation of these by-product streams will favor the reduction of the environmental impact and increase the economic benefits of local or regional agricultural areas in Europe (Lanchman et al., 2013).

Initially, the composition of the by-product streams used in this study was determined. For this purpose, a series of physicochemical analysis took place and the content of lignin, cellulose, hemicellulose, lipids, ash, protein, pectin and phenolic compounds was determined. The analysis results show that the grape stalks, grape pomace (skin and seeds) could be used to produce value added products (e.g. antioxidants). They also contain high amounts of cellulose and hemicellulose that could be used for the production of C5 and C6 sugars, which subsequently could be used as carbon sources for microbial production of succinic acid. Succinic acid is a dicarboxylic acid with four carbon atoms and is a precursor compound for the synthesis of biodegradable polymers, chemicals, pharmaceuticals and also as an additive in the food industry.

The present study was conducted in order to utilize lignocellulosic waste streams from a winery, especially of the red variety 'Agiorgitiko'. A series of chemical and biological processes took place in order to obtain hydrolysates rich in sugars. Pretreatment of grape stalks and grape pomace is based on alkaline hydrolysis to remove lignin, followed by acid hydrolysis to degrade hemicellulose and, finally, the enzymatic hydrolysis of cellulose. The chemical hydrolysis of hemicellulose was carried out using sulfuric acid at 121°C, while the bioconversion of cellulose has been achieved using cellulase complexes. The hydrolysis leads to the production of fermentable sugars that can be further exploited through fermentation. The processing of lees includes the initial separation of ethanol, phenolic compounds and tartaric acid



as value-added co-products followed by the enzymatic hydrolysis of the remaining solids to obtain a hydrolysate rich in various nutrients, which can be used as a nutrient-rich supplement in fermentation processes.

Using the hydrolysate of hemicellulose as a carbon source and the hydrolysate of wine lees as a nitrogen source, fermentations using the bacterium *Actinobacillus succinogenes* 130Z were carried out in order to produce succinic acid. The microorganism was able to grow in the hydrolysates and to consume sugars producing more than 7 g/L of succinic acid concentration using entirely the winery's waste streams. The results of this study show that the winery's waste streams could be fully valorised so that a conventional winery could be converted into a modern biorefinery.

Key words: grape stalks, grape pomace (skin and seeds), winelees, *Actinobacillus succinogenes*, succinic acid.

## Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Η ποικιλία Αγιωργίτικο .....	9
1.1.1. Ερυθρή οινοποίηση.....	9
1.2. Λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα .....	11
1.2.1. Κυτταρίνη .....	12
1.2.1.1. Κυτταρινάσες .....	12
1.2.2. Ημικυτταρίνη .....	13
1.2.3. Λιγνίνη .....	14
1.3. Λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα οινοποιείου .....	14
1.3.1. Στέμφυλα – γίγαρτα .....	15
1.3.2. Βόστρυχοι .....	16
1.4. Οινολάσπη .....	17
1.4.1. Πρωτεολυτικά ένζυμα.....	18
1.5. Συστατικά που περιέχονται στην πρώτη ύλη.....	19
1.5.1. Διαιτικές ίνες.....	19
1.5.2. Φαινολικές ενώσεις.....	19
1.5.3. Ταννίνες .....	21
1.5.4. Πηκτίνες.....	22
1.5.5. Λιπαρές ύλες.....	22
1.5.6. Πρωτεΐνες.....	23
1.6. Μικροβιακή παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος .....	24
1.6.1. Το ηλεκτρικό οξύ .....	24
1.6.2. Εφαρμογές του ηλεκτρικού οξέος .....	26
1.6.3. Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από μικροοργανισμούς.....	27
1.6.4. Βακτήρια και υποστρώματα για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.....	30
1.6.5. <i>Actinobacillus succinogenes</i> .....	30
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	33
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
3.1. Πρώτη ύλη .....	34
3.2. Επεξεργασία και αναλύσεις της λιγνοκυτταρινούχας ύλης.....	34
3.2.1. Προσδιορισμός υγρασίας.....	36
3.2.2. Προσδιορισμός τέφρας .....	36

3.2.3.	Απομάκρυνση ελευθέρων σακχάρων .....	37
3.2.4.	Εκχύλιση λιπαρών υλών .....	37
3.2.4.1.	Μέθοδος Soxhlet.....	37
3.2.4.2.	Εκχύλιση λιπαρής ύλης με εξάνιο .....	38
3.2.5.	Προσδιορισμός ολικών φαινολικών .....	39
3.2.5.1.	Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη και υπερήχους.....	39
3.2.5.2.	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων (Folin-Ciocalteu).....	40
3.2.5.3.	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών συστατικών (DPPH) 42	
3.2.6.	Προσδιορισμός αδιάλυτων διαιτητικών ινών .....	45
3.2.7.	Προσδιορισμός περιεκτικότητας λιγνοκυτταρινούχων .....	47
3.2.8.	Προσδιορισμός πρωτεϊνών .....	51
3.2.9.	Προσδιορισμός πηκτινών.....	53
3.2.10.	Προσδιορισμός ταννινών .....	54
3.3.	Υδρολύσεις .....	57
3.3.1.	Αλκαλική υδρόλυση λιγνίνης .....	57
3.3.2.	Όξινη υδρόλυση ημικυτταρίνης.....	58
3.3.3.	Ενζυμική Υδρόλυση κυτταρίνης.....	58
3.3.4.	Χημικές αναλύσεις μετά τις υδρολύσεις για την ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση των σακχάρων.....	60
3.3.4.1.	Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων .....	60
3.3.4.2.	Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	60
3.4.	Επεξεργασία και αναλύσεις της οινολάσπης .....	61
3.4.1.	Απομάκρυνση φαινολικών συστατικών .....	63
3.4.2.	Απομάκρυνση τρυγικού οξέος.....	63
3.4.3.	Καλλιέργεια στερεής κατάστασης του μύκητα <i>Aspergillus oryzae</i> σε πίτυρο 63	
3.4.4.	Υδρόλυση οινολάσπης προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας κατάλληλο για μικροβιακές ζυμώσεις.....	64
3.4.4.1.	Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN analysis) 65	
3.5.	Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων.....	66
3.5.1.	Αξιοποίηση αποβλήτων οينوποιείου για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος 66	
3.5.2.	Βιολογικό Υλικό .....	67

3.5.2.1.	Παρασκευή εμβολίου.....	67
3.5.2.2.	Αποθήκευση.....	68
3.5.3.	Θρεπτικά υποστρώματα.....	68
3.5.4.	Ασυνεχής καλλιέργεια με θρεπτικά μέσα απόβλητα οινοποιείου .....	68
3.5.4.1.	Αποστείρωση και εμβολιασμός .....	69
3.5.4.2.	Συνθήκες ζύμωσης διαλείποντος έργου.....	69
3.5.5.	Αναλυτικές μέθοδοι .....	69
3.5.5.1.	Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN analysis) 69	
3.5.5.2.	Προσδιορισμός και μέτρηση του pH .....	69
3.5.5.3.	Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας.....	70
3.5.5.4.	Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	70
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	71
4.1.1.	Μέτρηση υγρασίας.....	71
4.1.2.	Μέτρηση ελεύθερων σακχάρων και pH .....	71
4.1.3.	Προσδιορισμός τέφρας .....	72
4.1.4.	Μέτρηση λιπαρής ύλης.....	73
4.1.5.	Μέτρηση των πρωτεϊνών .....	73
4.1.6.	Προσδιορισμός ολικών Φαινολικών και αντιοξειδωτικής ικανότητας....	74
4.1.7.	Προσδιορισμός πηκτινών.....	78
4.1.8.	Σύσταση λιγνοκυτταρινούχων συστατικών .....	78
4.2.1.	Υδρόλυση λιγνίνης .....	81
4.2.2.	Υδρόλυση ημικυτταρίνης .....	83
4.2.3.	Ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης .....	87
4.3.	Οινολάσπη .....	91
4.4.	Ζυμώσεις διαλείποντος έργου.....	91
4.4.2.	Ζυμώσεις με θρεπτικό υπόστρωμα το υδρόλυμα ημικυτταρίνης από τα απόβλητα οινοποιείου .....	92
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	99
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	101
6.1.	Ξένη Βιβλιογραφία .....	101
6.2.	Ελληνική Βιβλιογραφία .....	110

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η καλλιέργεια σταφυλιών αποτελεί τη μεγαλύτερη καλλιέργεια φρούτου παγκοσμίως. Περισσότερα από 60 εκατομμύρια τόνοι σταφυλιού παράγονται παγκοσμίως κάθε χρόνο. Σύμφωνα με τα στοιχεία του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου (OIV) η χώρα μας κατατάσσεται στη δωδέκατη θέση παγκοσμίως όσον αφορά στην ετήσια παραγόμενη ποσότητα οίνου για το έτος 2013 με 3.700 εκατομμύρια εκατόλιτρα, με το 40% να αποτελεί τον ερυθρό ενώ το 60% τον λευκό οίνο (Vlyssides et al., 2005). Στην Ευρώπη, ετησίως συλλέγονται 14,5 εκατομμύρια τόνοι αποβλήτων οινοποιείων (Teixeira et al., 2014). Κατά την διαδικασία της οινοποίησης συλλέγονται παραπροϊόντα οργανικά και ανόργανα ενώ γίνεται και εκπομπή αερίων (Teixeira et al., 2014).

Τα απόβλητα οινοποιίας περιλαμβάνουν τα στέμφυλα, τα γίγαρτα και τους βοστρύχους τα οποία είναι κυρίως λιγνινοκυτταρινούχα υπολείμματα καθώς και την οινολάσπη. Τα οινοποιεία είναι στην πλειοψηφία τους επιχειρήσεις μικρής κλίμακας που δεν έχουν τη δυνατότητα να καλύψουν το κόστος εγκατάστασης συστημάτων επεξεργασίας των στερεών τους αποβλήτων, με αποτέλεσμα να τα διαχειρίζονται με περιβαλλοντικά μη-αποδεκτές μεθόδους. Μετά το πέρας της οινοποίησης, σε μερικές περιπτώσεις, τα απόβλητα είτε τα στερεά ή και τα υγρά συνήθως κατευθύνονται προς κομποστοποίηση ή απορρίπτονται στο περιβάλλον. Το ιδιαίτερα υψηλό οργανικό φορτίο των αποβλήτων δεν βιοαποικοδομείται εύκολα, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων οδηγούν στην εμφάνιση και βιοτοξικών φαινομένων που οδηγούν στην υποβάθμιση του φυσικού περιβάλλοντος. Η εναπόθεσή τους μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD) και του βιοχημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (BOD), λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε οργανικές ουσίες (Lafka et al., 2007; Prozil et al., 2012).

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 παράγονται από το πετρέλαιο. Πρώτο βήμα στην αξιοποίηση αυτών των ρευμάτων είναι ο μετασχηματισμός των υφιστάμενων βιομηχανιών σε ολοκληρωμένα και αειφόρα βιοδυλιστήρια (Koutinas et al., 2014).

## 1.1. Η ποικιλία Αγιωργίτικο

Η ποικιλία σταφυλιού Αγιωργίτικο (*Εικόνα 1*), είναι μια από τις πιο εκλεκτές ελληνικές ερυθρές ποικιλίες αμπέλου. Επίσης, είναι γνωστή και ως «Μαύρο Νεμέας», «Μαυρούδι» και «Νεμεάτικο». Η ράγα είναι μικρού έως μεσαίου μεγέθους, βάρους περίπου 2,6 g, σφαιρικού και ενίοτε ωοειδούς σχήματος. Ο φλοιός της είναι παχύς, ανθεκτικός. Κάθε ράγα φέρει δυο με τρία γίγαρτα, μετρίου μεγέθους, απιοειδούς σχήματος και με παχύ ράμφος. Οι ράγες αντιπροσωπεύουν το 95,57% του βάρους της σταφύλης (Σπινθηροπούλου, 2000).



**Εικόνα 1:** Ποικιλία σταφυλιού, Αγιωργίτικο Νεμέας, Ελλάδα.

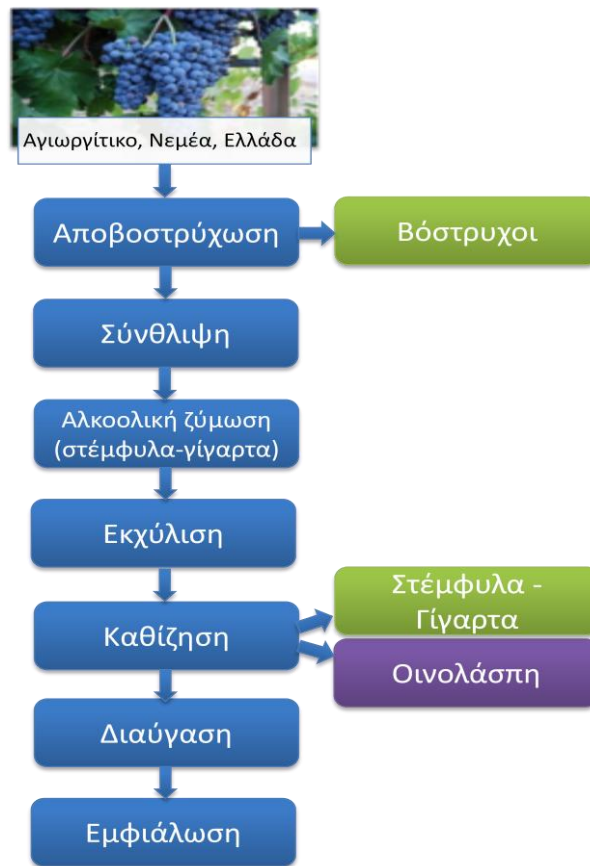
### 1.1.1. Ερυθρή οινοποίηση

Ως κλασσική μέθοδος ερυθής οινοποίησης θεωρείται η τεχνική, κατά την οποία πραγματοποιούνται ταυτόχρονα δύο φαινόμενα: α. η αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους παρουσία των στερεών μερών του σταφυλιού (φλοιοί, γίγαρτα και ενδεχομένως βόστρυχοι) και β. η εκχύλιση των συστατικών των στερεών μερών του σταφυλιού από το υδρο-αλκοολικό διάλυμα που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση.

Η κλασσική μέθοδος ερυθής οινοποίησης (*Σχήμα 1*) αποτελείται από τα εξής στάδια:

- Μηχανικές κατεργασίες (αποβοστρύχωση, έκθλιψη, απορραγισμός)
- Μεταφορά της σταφυλόμαζας στα δοχεία οινοποίησης (δεξαμενές, βαρέλια) με ταυτόχρονη θείωση

- Αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του χυμού του σταφυλιού παρουσία των στερεών, οπότε πραγματοποιείται ταυτόχρονα και η εκχύλιση διάφορων συστατικών που περιέχονται στα στερεά
- Διαχωρισμός του υγρού (γλεύκος σε ζύμωση ή κρασί ανάλογα με τη διάρκεια εκχύλισης) από τα στέμφυλα, μετά ή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης
- Παραμονή σε δεξαμενή ή δρύινο βαρέλι όπου θα ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση, σε περίπτωση που δεν έχει τελειώσει ήδη
- Διαύγαση και τέλος εμφιάλωση

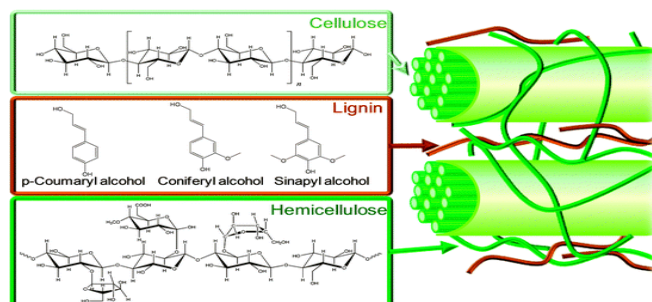


**Σχήμα 1:** Βασικά στάδια ερυθρής οινοποίησης και τα απόβλητα που προκύπτουν.

Όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 1, κατά την ερυθρή οινοποίηση προκύπτουν λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα (βόστρυχοι, στέμφυλα και γίγαρτα) καθώς και οινολάσπη.

## 1.2. Λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα

Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά (Εικόνα 2) αποτελούν την πιο άφθονη ανανεώσιμη πηγή πρώτων υλών σε βιομηχανικό επίπεδο. Έχουν αρκετά πολύπλοκη σύσταση που αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη (Brodeur et al., 2011).



**Εικόνα 2:** Δομή λιγνοκυτταρινούχας μάζας (Alonso et al., 2012).

Η κυτταρίνη έχει μορφή μικροϊνιδίων που σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου (Εικόνα 2). Αυτά τα μικροϊνίδια ενώνονται μεταξύ τους μέσω των ημικυτταρινών και άλλων άμορφων πολυμερών όπως είναι η λιγνίνη και η πηκτίνη (Brodeur et al., 2011). Τα μικροϊνίδια κυτταρίνης, τα οποία βρίσκονται στο σύμπλεγμα ημικυτταρίνης-λιγνίνης δημιουργούν μακροϊνίδια. Η δομή αυτών των ινιδίων κυτταρίνης έχουν ως επί το πλείστον κρυσταλλικό χαρακτήρα και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά σε προσβολή από ένζυμα (περιορισμένη προσβασιμότητα στις αλυσίδες κυτταρίνης). Η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης είναι πιο εφικτή όταν βρίσκεται στη μη κρυσταλλική μορφή. Η παρουσία της λιγνίνης παρεμποδίζει επίσης την ενζυμική υδρόλυση, καθώς τα ένζυμα δεσμεύονται στην επιφάνεια της λιγνίνης και ως εκ τούτου δεν ενεργούν για την υδρόλυση της κυτταρίνης (Palonen et al., 2004). Γι' αυτό το λόγο απαιτείται προεπεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχου μάζας πριν την βιομετατροπή της κυτταρίνης.



### 1.2.1. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι πολυμερές με δομική μονάδα τη γλυκόζη. Πιο συγκεκριμένα είναι ένα γραμμικό πολυμερές αποτελούμενο από μόρια άνυδρο-D-γλυκοπυρανόζης τα οποία ενώνονται με  $\beta$ -1,4-γλυκοζιτικό δεσμό και το κάθε μονομερές έχει τρεις ελεύθερες υδροξυλομάδες. Αποτελείται από περίπου 60% κρυσταλλικά τμήματα και έχει μικρή διαλυτότητα λόγω του μεγάλου δικτύου δεσμών υδρογόνου μέσα στο μόριο αλλά και μεταξύ διαφορετικών μορίων. Τα κρυσταλλικά τμήματα διακόπτονται από άμορφες περιοχές που γίνονται κρυσταλλικές σε περίπτωση απομάκρυνσης της υγρασίας. Η κυτταρίνη μπορεί να θεωρηθεί ως ισοτακτικό πολυμερές κελλοβιόζης. Οι ίνες της κυτταρίνης μπορούν να ενσωματωθούν σε θερμοπλαστικά πολυμερή και να τα ενισχύσουν.

#### 1.2.1.1. Κυτταρινάσες

Οι κυτταρινάσες (Εικόνα 3) είναι τα ένζυμα που διασπούν την κυτταρίνη. Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται τα εξής ένζυμα:

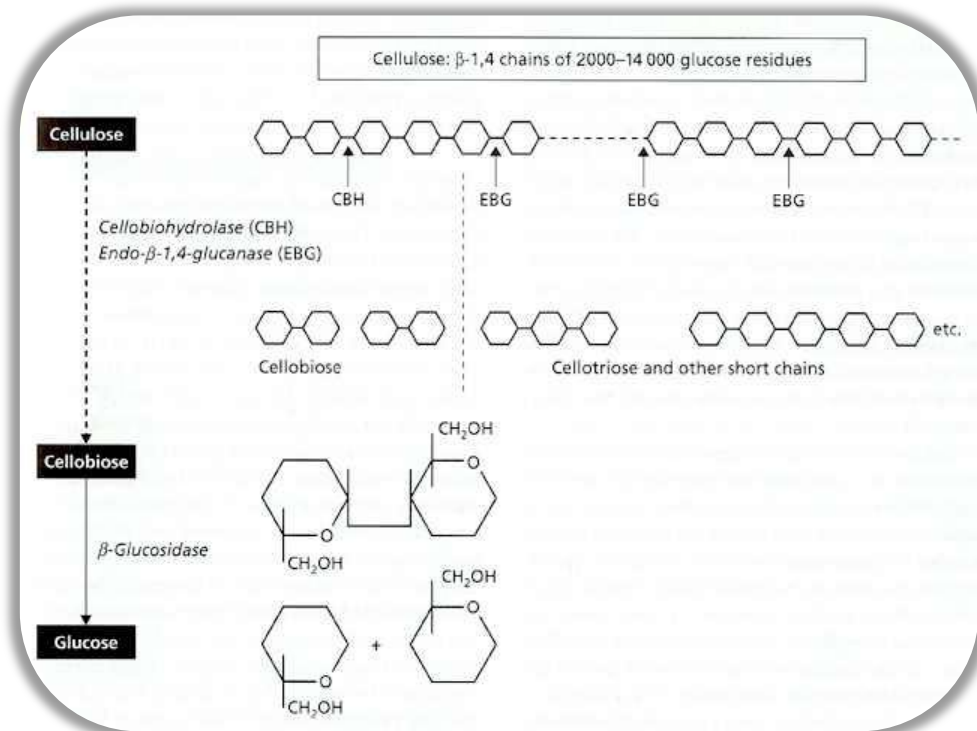
- α) ενδογλυκανάση (1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolase, EC-3.2.1.4, CMCase),
- β) κελλοβιοϋδρολάση (1,4- $\beta$ - D-glucan 4-cellobiohydrolase, EC-3.2.1.91) και
- γ)  $\beta$ -1,4-γλυκοζιδάση ( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase EC-3.2.1.21).

Η ενδογλυκανάση υδρολύει τους εσωτερικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς της κυτταρίνης σε τυχαία σημεία. Το ένζυμο αυτό δεν δρα στην κρυσταλλική κυτταρίνη αλλά στα παράγωγα της κυτταρίνης (καρβοξυμεθυλο- και υδροξυμεθυλο- κυτταρίνη) και στις κυτταρινοδεξτρίνες αλλά δεν δρα στην κελλοβιόζη. Οι ενδογλυκανάσες δρουν σε pH μεταξύ 4,5 και 6,5 και παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα έναντι της θερμοκρασίας. Σε πολλά από αυτά τα ένζυμα η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης φθάνει έως τους 60 °C.

Η κελλοβιοϋδρολάση ή αλλιώς εξωγλυκανάση δρα κυρίως μετά τη δράση της ενδογλυκανάσης πάνω στα νέα άκρα των αλυσίδων (σύγχρονη δράση των δύο ενζύμων). Η κελλοβιοϋδρολάση υδρολύει τους εξωτερικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς,

στο μη αναγωγικό άκρο της κυτταρίνης και απελευθερώνει κελλοβιόζη. Δεν δρα στα παράγωγα της κυτταρίνης και παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση από εκείνη της ενδογλυκανάσης.

Τέλος, η β-1,4-γλυκοζιδάση συμπληρώνει τη δράση υδρολύοντας την κελλοβιόζη και κυτταρινο-ολισακχαρίτες (μέχρι 4 μόρια γλυκόζης και γλυκοζίτες) παράγοντας γλυκόζη.



**Εικόνα 3:** Ενζυμική διάσπαση της κυτταρίνης με τη δράση των κυτταρινολυτικών ενζύμων.

### 1.2.2. Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη έχει μικρότερο μοριακό βάρος από την κυτταρίνη και αποτελείται κυρίως από πεντόζες, όπως ξυλόζη και αραβινόζη και εξόζες, όπως μαννόζη, γλυκόζη και γαλακτόζη. Οι πεντοζάνες είναι πολυμερή ξυλόζης με πλευρικές αλυσίδες από άλλες ενώσεις πεντοζών. Απαντούν στα δημητριακά σε περιεκτικότητα 2-8%. Ένα μέρος των πεντοζανών είναι υδατοδιαλυτές ενώ οι αδιάλυτες πεντοζάνες χαρακτηρίζονται ημικυτταρίνες.

### **1.2.3. Λιγνίνη**

Η λιγνίνη είναι ένα τρισδιάστατο μακρομόριο που σχηματίζεται από τρία μονομερή. Αυτά είναι η π-κουμαρυλική-αλκοόλη, η κωνιφερυλική αλκοόλη και η σιναπυλική αλκοόλη. Η λιγνίνη είναι ένα ακανόνιστο μακρομόριο με ισχυρές διακλαδώσεις στη δομή της και οι βασικές συμμετέχουσες δομές έχουν εννέα άτομα άνθρακα (C<sub>9</sub>). Η δομή της ποικίλει ανάλογα με την προέλευση. Ρόλος της λιγνίνης είναι να παρέχει ακαμψία στα φυτικά κύτταρα και αντίσταση έναντι μικροβιακών επιθέσεων. Η λιγνίνη εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες σε απόβλητα, όπως στα κελύφη των αράπικων φιστικιών, σε υπολείμματα καλαμοσακχάρου μετά την εκσακχάρωση, ροκανίδια ξύλου κ.α.

Η δομή της λιγνίνης υφίσταται χημική τροποποίηση στη φαινολική και αλειφατική υδροξυλομάδα για να οδηγήσει στη σύνθεση πολυμερών (πολυουρεθάνες, πολυεστέρες), τα οποία είναι θερμικώς σταθερά αλλά και με αυξημένες μηχανικές ιδιότητες λόγω της παρουσίας βενζολικών δακτυλίων. Η βιοδιάσπαση της λιγνίνης πραγματοποιείται με εξωκυτταρικά λιγνολυτικά ένζυμα όπως είναι η υπεροξειδάση της λιγνίνης και οι λακάσσες. Τα ένζυμα αυτά οξειδώνουν τα φαινολικά συστατικά ενώ τα παραπροϊόντα της βιοδιάσπασης είναι αρωματικά μονομερή λιγνίνης, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πολυεστέρων και πολυολών.

### **1.3. Λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα οινοποιείου**

Τα αγρο-βιομηχανικά υπολείμματα οινοποιείου είναι οι βόστρυχοι, τα γίγαρτα, τα στέμφυλα και τα απόνερα. Αναλόγως των διαφόρων συνθηκών, όπως για παράδειγμα η συγκομιδή των σταφυλιών, τα στέμφυλα και τα γίγαρτα μπορεί να αντιπροσωπεύουν περίπου το 20-30% του βάρους των σταφυλιών, εκ των οποίων το 73-90% αποτελούν τα στέμφυλα και το 6-20% τα γίγαρτα (Dwyer et al., 2014; Teixeira et al., 2014; Llobera & Canellas, 2007).

### **1.3.1. Στέμφυλα – γίγαρτα**

Βάσει του Καν. (ΕΚ) 479/2008, ως στέμφυλα σταφυλιών ορίζονται τα υπολείμματα που προκύπτουν από την πίεση των νωπών σταφυλιών, είτε έχουν είτε δεν έχουν υποστεί ζύμωση. Τα στέμφυλα είναι η μάζα που απομένει μετά τη συμπίεση των σταφυλιών, τα οποία κατά την ερυθρή οινοποίηση παραμένουν με το γλεύκος για τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, με σκοπό την εκχύλιση των χρωστικών (ανθοκυανίνες). Η μάζα αυτή συνίσταται κυρίως από τους φλοιούς της ράγας του σταφυλιού, τα γίγαρτα και από τους βοστρύχους. Το ποσοστό των βοστρύχων που περιέχουν τα στέμφυλα εξαρτάται από το βαθμό αποβοστρύχωσης που έχει προηγηθεί.

Ο φλοιός αποτελείται από την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και την υποδερμίδα που απαρτίζουν το μεμβρανώδες και ελαστικό περικάρπιο της ράγας. Η επιδερμίδα αποτελείται από μία-δύο στιβάδες λεπτών πεπλατυσμένων κυττάρων με μεμβράνες μάλλον παχιές και ανθεκτικές ενώ βαθύτερα υπάρχουν 6-10 στιβάδες κυττάρων μεγαλύτερων διαστάσεων από εκείνα της επιδερμίδας, τα οποία αποτελούν την υποδερμίδα. Το εξωτερικό τοίχωμα των κυττάρων της επιδερμίδας αποτελεί την εφυμενίδα, η οποία καλύπτεται από ένα κηρώδες επικάλυμμα, την ανθηρότητα (κοινώς λεγόμενο χνούδι) που παίζει ρόλο στον έλεγχο της επιδερμικής διαπνοής. Στα στέμφυλα, αναφέρεται ότι περιέχεται ποσοστό φαινολικών ενώσεων, η περιεκτικότητα των οποίων εξαρτάται από την διαδικασία της οινοποίησης (χρόνος εκχύλισης, θερμοκρασία και άλλοι παράγοντες) (Teixeira et al., 2014).

Ρόλος των στεμφύλων είναι ότι λειτουργούν ως προστασία από φυσικούς και κλιματικούς τραυματισμούς, όπως είναι η μόλυνση από κάποιο μύκητα και η υπεριώδης ακτινοβολία. Τα φρέσκα στέμφυλα μπορούν να διατεθούν ως ζωοτροφή. Μετά από χώνευση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα βελτιωτικό εδάφους αυτούσιο ή έπειτα από εμπλουτισμό (Τσακίρης, 1998). Τέλος τα στέμφυλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα προς παραγωγή μανιταριών.

Τα γίγαρτα, κοινώς τα κουκούτσια, είναι οι σπόροι της αμπέλου. Στην εγκάρσια τομή ενός γιγάρτου διαπιστώνεται ότι αυτό αποτελείται από τη σάρκα ή λευκωματώδη ιστό που προστατεύεται εξωτερικά από το κέλυφος ή επισπέρμιο και περικλείει το έμβρυο. Ο λευκωματώδης ιστός, είναι πλούσιος σε αποθησαυριστικές

ουσίες που εξασφαλίζουν την αύξηση του εμβρύου κατά τη βλάστηση του γιγάρτου. Το έμβρυο αποτελείται από κύτταρα πλούσια σε αλατούχες ουσίες, ενώ το κέλυφος ή επισπέρμιο αποτελείται από τρεις χιτώνες όπου κατά τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης εμπλουτίζεται σε φαινολικά παράγωγα (Τσακίρης, 1998).

Το μίγμα των στεμφύλων-γιγάρτων έχει ένα εύρος εφαρμογών που περιλαμβάνει τα λειτουργικά τρόφιμα (διαιτητικές ίνες, πολυφαινόλες), τη μεταποίηση τροφίμων (βιοεπιφανειοδραστικά) και τα φαρμακευτικά συμπληρώματα. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή κιτρικού οξέος, μεθανόλης, αιθανόλης και ξανθάνης μέσω ζύμωσης καθώς και για την παραγωγή ενέργειας μέσω μεθανοποίησης (Dwyer et al., 2014; Teixeira et al., 2014; Llobera & Canellas, 2007). Η πιο συχνή χρήση των στεμφύλων είναι προς παραγωγή αποσταγμάτων μέσω απόσταξης (π.χ. τσίπουρο).

### **1.3.2. Βόστρυχοι**

Οι βόστρυχοι αποτελούν μέρος των στερεών αποβλήτων οινοποιείου, οι οποίοι με την αποβοστρύχωση αφαιρούνται από τα σταφύλια πριν την έναρξη της διαδικασίας της οινοποίησης. Η απομάκρυνσή τους πριν την αλκοολική ζύμωση είναι απαραίτητη, καθώς η παρουσία τους μπορεί να προσδώσει αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά λόγω υψηλής στυπτικότητας. Βεβαίως πολλές φορές η αποβοστρύχωση δεν πετυχαίνεται πλήρως, οπότε ποσότητες βοστρύχων που κυμαίνονται στο 2-8% συμμετέχουν στη ζύμωση (Teixeira et al., 2014; Gonzalez-Centeno et al., 2010). Η συμμετοχή των βοστρύχων στην οινοποίηση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ολικής οξύτητας (Τσακίρης, 1998). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες αναφορές που να αφορούν την αξιοποίηση των βοστρύχων, ενώ οι περισσότερες από αυτές αφορούν την αξιοποίηση τους λόγω μεγάλης περιεκτικότητας σε διαιτητικές ίνες, αλλά και απομάκρυνσης βαρέων μετάλλων (Martinez et al., 2006; Villaescusa et al., 2002) και ανάκτησης φυσικών αντιοξειδωτικών (Spigno et al., 2007).

#### 1.4. Οινολάσπη

Ένα άλλο στερεό απόβλητο της διαδικασίας της οينوποίησης είναι η οινολάσπη. Η απομάκρυνση της οινολάσπης (απολάσπωση) είναι απαραίτητη συνέπεια της μηχανικής κατεργασίας του σταφυλιού. Ως οινολάσπη ορίζεται: α) το υπόλειμμα που συσσωρεύεται στον πυθμένα των δοχείων που περιέχουν οίνο μετά τη ζύμωση, κατά την αποθήκευση ή μετά από επιτρεπόμενες επεξεργασίες, β) το υπόλειμμα που συσσωρεύεται στα δοχεία τα οποία περιέχουν γλεύκος και γ) το υπόλειμμα που μένει μετά από φιλτράρισμα ή φυγοκέντρηση του προϊόντος της περίπτωσης α και β (Καν. (ΕΚ) 479/2008).

Υπολογίζεται ότι η παραγόμενη ποσότητα οινολάσπης μπορεί να φθάσει έως και το 8,5% της αρχικής μάζας του σταφυλιού (Nerantzis & Tataridis 2006) ή το 6% της συνολικής ποσότητας του παραγόμενου οίνου (Zhihui et al. 2008). Η σύστασή της είναι πλούσια σε β-γλυκάνες, λόγω των ζυμομυκήτων που απέμειναν από τη ζύμωση του οίνου, σε τρυγικό οξύ και αιθανόλη, προϊόντα τα οποία μπορούν να ανακτηθούν και να αποτελέσουν χρήσιμες πρώτες ύλες για τη βιομηχανία τροφίμων (Nerantzis & Tataridis 2006). Η ποσοστιαία αναλογία των επιμέρους συστατικών της οινολάσπης ποικίλει και είναι ανάλογη της χημικής σύστασης του οίνου από τον οποίο προήλθε, καθώς και από την περίοδο εκβλάστησης των αμπελώνων (Farkas, 1988; Pérez-Serradilla & Luque de Castro 2008).

Η οινολάσπη έχει πληθώρα εφαρμογών καθώς με επεξεργασία, μπορούν να προκύψουν πολλά προϊόντα προστιθέμενης αξίας όπως αιθανόλη και τρυγικό οξύ. Επίσης στην οινολάσπη απελευθερώνονται ένζυμα που ευνοούν την υδρόλυση και μετατροπή των πολυφαινολών σε φαινολικές ενώσεις όπως είναι το γαλλικό οξύ (Teixeira et al., 2014). Τέλος μέσω ζυμώσεων είναι εφικτό να παραχθεί γλυκονικό οξύ, κιτρικό οξύ και μικροβιακό λίπος. Η οινολάσπη υδρολύεται από τις πρωτεάσες που αναλύονται παρακάτω (κεφ. 1.4.1.). Η σύσταση της οινολάσπης παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Σύνθεση οινολάσπης, προερχόμενα από ερυθρή οينوποίηση (Zhihui et al. 2008).

Παράμετρος	Οινολάσπη
Συνολικοί υδατάνθρακες (% w/v)	5,6
Ινώδεις ουσίες (% w/w)	-
Τέφρα (% w/w)	-
Άζωτο (Kjeldahl) (mg/L)	413
Αμμωνιακό άζωτο (mg/L)	31,8
Συνολικός φώσφορος (mg/L)	48,5
Συνολικά στερεά (g/L)	85,0
COD (g/L)	102,6
BOD (g/L)	70,3

#### 1.4.1. Πρωτεολυτικά ένζυμα

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και είναι γνωστά ως πρωτεάσες. Πρόκειται για υδρολυτικά ένζυμα που δρουν στους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών. Αποτελούν μία μεγάλη ομάδα ενζύμων με αρκετές διαφορές στις φυσικοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες. Παράγονται τόσο εξωκυτταρικά όσο και ενδοκυτταρικά και παίζουν σπουδαίο ρόλο στον μεταβολισμό των κυττάρων και στις διεργασίες τους. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα παράγονται κυρίως από τα γένη *Aspergillus*, *Penicillium* και *Rhizopus*, ενώ βρίσκουν ένα πλήθος εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων τις τελευταίες δεκαετίες, όπως για παράδειγμα στην τεχνολογία παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων, στην παραγωγή μύρας, στην ωρίμανση (σίτεμα) του κρέατος, στη βελτίωση του ψωμιού και των προϊόντων ζαχαροπλαστικής κ.α. (Poldermans 1990; Oner & Akar 1993; Γαλιώτου-Παναγιώτου 2006; Negi & Benerjee 2006).

Όσον αφορά την παραγωγή πρωτεασών από μύκητες έχει αναφερθεί ότι η στερεή καλλιέργεια είναι ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος, λόγω της χαμηλής απαίτησής τους σε νερό σε σχέση με τα βακτήρια. Επίσης, η καλλιέργεια στερεής κατάστασης προσφέρει υψηλές αποδόσεις στην παραγωγή ενζύμων, ενώ ταυτόχρονα είναι απλή και χαμηλού κόστους και τα ένζυμα που παράγονται είναι πιο συμπυκνωμένα σε σύγκριση με την καλλιέργεια υγρής κατάστασης. Ωστόσο, και η στερεή καλλιέργεια παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η ατελής αξιοποίηση των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος λόγω της χαμηλής παροχής οξυγόνου (Chutmanop et al. 2008).

## **1.5. Συστατικά που περιέχονται στην πρώτη ύλη**

### **1.5.1. Διαιτητικές ίνες**

Οι φυτικές ή διαιτητικές ίνες αποτελούν το βρώσιμο τμήμα των φυτικών τροφίμων, οι οποίες δεν μπορούν να πεφθούν ή να απορροφηθούν στο λεπτό έντερο και περνούν ανέπαφες στο παχύ έντερο. Περιλαμβάνουν μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες (π.χ. κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, κόμμεα, πηκτίνες), ολιγοσακχαρίτες (π.χ. ινουλίνη), λιγνίνη και συναφή φυτικά συστατικά (π.χ. κηροί, σουβερίνη). Ο όρος φυτικές ίνες περιλαμβάνει επίσης έναν τύπο αμύλου που είναι γνωστός και ως ανθεκτικό άμυλο επειδή αντιστέκεται στην πέψη στο λεπτό έντερο και φθάνει στο παχύ έντερο ανέπαφο.

Οι διαιτητικές ίνες διακρίνονται σε διαλυτές και αδιάλυτες σε νερό. Στην κατηγορία διαλυτές στο νερό ανήκουν οι πηκτίνες, τα πολυμερή του γαλακτουρονικού οξέος, τα πολυμερή μονοσακχαριτών που σχηματίζουν πηκτές στο νερό και τα κόμμεα. Από την άλλη, στην κατηγορία των αδιάλυτων ινών στο νερό ανήκουν η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, η ινουλίνη και η λιγνίνη.

Οι φυτικές ίνες που καταναλώνει ο οργανισμός φτάνουν στο παχύ έντερο, όπου υφίστανται μερική ή ολική ζύμωση από τα βακτήρια του εντέρου. Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης παράγονται διάφορα παραπροϊόντα, λιπαρά οξέα μικρής ανθρακικής αλυσίδας καθώς και αέρια. Οι ευεργετικές συνέπειες των φυτικών ινών στην υγεία οφείλονται στη συνδυασμένη δράση της διαδικασίας ζύμωσης και της παραγωγής των ανωτέρων παραπροϊόντων.

### **1.5.2. Φαινολικές ενώσεις**

Με τον όρο φαινολικές ενώσεις υποδηλώνεται ότι στο μόριο αυτών των ουσιών υπεισέρχονται μία ή περισσότερες δραστικές φαινολικές ομάδες. Η ταξινόμηση τους περιλαμβάνει δύο μεγάλες κατηγορίες: τις φλαβονοειδείς και τις μη φλαβονοειδείς φαινόλες. Στην κατηγορία των φλαβονοειδών φαινολών υπάγονται οι πολυμοριακές φαινόλες με βασικό χημικό τύπο C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, ο οποίος αντιστοιχεί στη



φλαβανόνη από την οποία απορρέει και το όνομα της κατηγορίας αυτής. Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ένα βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα του τύπου της φλαβόνης. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανόλες, οι κατεχίνες, οι προκυανιδίνες, οι ανθοκυάνες και τα πολυμερισμένα τους παράγωγα καθώς και οι ταννίνες (Κοτσερίδης, 2005). Στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών φαινολών υπάγονται μονομοριακά φαινολικά παράγωγα τα οποία βρίσκονται στους φυτικούς ιστούς και τα διάφορα φυτικά προϊόντα (Castaneda et al., 2009). Στην κατηγορία των φαινολοξέων ανήκουν τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (γαλλικό οξύ, βανιλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, συριγγικό οξύ κ.α.), τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (π-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ κ.α.) καθώς επίσης και τα στιλβένια, που είναι περισσότερο πολύπλοκες ενώσεις με δυο βενζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται με ένα αιθάνιο ή μια αιθυλενική αλυσίδα (ρεσβερατρόλη) (Κουράκου, 1998).

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 τις δυο αυτές προϋποθέσεις 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 (Ciccio et al., 2009). Η μέθοδος προσδιορισμού των ολικών φαινολών με τη 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.

### **1.5.3. Ταννίνες**

Το όνομα ‘ταννίνες’ προέρχεται από την κέλτικη λέξη “tan” που σημαίνει βελανιδιά, στα φύλλα της οποίας σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες των ουσιών αυτών. Η σύνθεση τους είναι εντονότερη μετά από κάποιο τραυματισμό του φυτικού ιστού, όπου καταστρέφονται τα κύτταρα και η υπάρχουσα διαμερισματοποίησή τους. Λόγω αυτής της καταστροφής, οι πολυφαινολικές οξειδάσες έρχονται σε επαφή με τα φαινολικά υποστρώματα όπως το γαλλικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και τα φλαβονοειδή. Η οξειδωση των φαινολικών ενώσεων από τις πολυφαινολικές οξειδάσες παράγει κινόνες, οι οποίες πολυμερίζονται και σχηματίζουν ταννίνες και θεωρούνται προστατευτικές ουσίες απέναντι στην προσβολή των φυτών από μικροοργανισμούς.

Ανάλογα με τη φύση της βασικής μονάδας, οι ταννίνες διακρίνονται σε συμπυκνωμένες (ή ταννίνες της κατεχίνης) και σε υδρολυμένες (ή ταννίνες του γαλλικού οξέος). Μόνο οι υδρολυμένες ταννίνες περιέχονται στους οίνους (Σουφλερός, 2000). Η θέρμανση των ταννινών σε όξινο περιβάλλον οδηγεί στο σχηματισμό κυρίως ερυθρής κυανιδίνης, αποδίδοντας τους τον όρο προκυανιδίνες (Κοτσερίδης, 2005). Οι ταννίνες απαντούν στα στερεά μέρη του σταφυλιού, κυρίως στα γίγαρτα. Στα γίγαρτα βρίσκονται στην εφυμενίδα και στον κερατοειδή ιστό του κελύφους και αποδεσμεύονται στο περιβάλλον μόνο όταν η επιδερμίδα γίνει διαλυτή (Castaneda et al., 2009). Οι ταννίνες των γιγάρτων είναι προκυανιδίνες με σχετικά μικρό βαθμό πολυμερισμού που αυξάνεται κατά την πορεία ωρίμανσης και είναι χαρακτηριστικές για την έντονη στυπτικότητα τους (Ribereau-Gayon et al., 2000). Οι ταννίνες του φλοιού παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού, καθώς αποτελούνται από περισσότερες από 80 μονάδες. Τέλος, οι ταννίνες των βοστρύχων είναι πολυμερισμένες προκυανιδίνες με παρόμοια συμπεριφορά των ταννινών των γιγάρτων και παρόμοιας έντονης στυπτικότητας.

#### 1.5.4. Πηκτίνες

Οι πηκτίνες ανήκουν στους πολυσακχαρίτες, είναι υδρόφιλα κολλοειδή τα οποία έχουν την ικανότητα να απορροφούν και να συγκρατούν μεγάλες ποσότητες νερού. Ως φυσικά συστατικά των φυτικών ιστών οι πηκτινικές ουσίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην υφή και τη συνεκτικότητα των φρούτων και λαχανικών. Οι μεταβολές των πηκτινικών ουσιών έχουν ως αποτέλεσμα το μαλάκωμα της σάρκας φρούτων κατά την ωρίμανση, τις μεταβολές στη θολερότητα των πολτών και των συμπυκνωμάτων φρούτων και την απώλεια της κολλοειδούς σταθερότητας στους χυμούς φρούτων. Αποτελείται από μακριές ευθύγραμμες αλυσίδες πολυγαλακτουρονικού οξέος, με δεσμό α-1,4 και οι καρβοξυλικές ομάδες είναι εν μέρει εστεροποιημένες με μεθυλική αλκοόλη. Στα φυτικά κύτταρα εντοπίζονται σε μορφή πρωτοπηκτινών (Εικόνα 4) οι οποίες ενώνονται με την κυτταρίνη και είναι αδιάλυτες στο νερό (Brodeur et al., 2011).



Πηκτίνη

**Εικόνα 4** : Δομή πηκτίνης που αποτελείται από μονάδες πολυγαλακτουρονικού οξέος.

Οι πηκτίνες χρησιμοποιούνται ως προσθετικά τροφίμων ως διογκωτικοί και πηκτωματογόνοι παράγοντες εξαιτίας της ικανότητας τους να σχηματίζουν πηκτές και να μεταβάλλουν τη ρευστότητα των προϊόντων. Οι πηκτίνες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πηκτικός παράγοντας στη ζαχαροπλαστική ή σε αντικατάσταση του λίπους στο κρέας (Galanakis, 2012).

#### 1.5.5. Λιπαρές ύλες

Τα λίπη και έλαια ανήκουν σε μια ομάδα οργανικών ουσιών, τα λιπίδια, η οποία θεωρείται η πλέον ετερογενής ομάδα ακόμη και εκείνης των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών. Χαρακτηρίζονται από την κοινή ιδιότητα τους να διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες όπως αιθέρα, χλωροφόρμιο, βενζόλιο κ.α., ενώ είναι αδιάλυτα

στο νερό. Τα λίπη και έλαια είναι γλυκερίδια, δηλαδή εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα.

Μεγάλο ποσοστό λιπαρών υλών εντοπίζεται στα γίγαρτα. Όπως αναφέρουν οι Da Porto et al. (2013), τα γίγαρτα των ερυθρών σταφυλιών έχουν περιεκτικότητα σε λίπος 13,1-19,6% (v/w), η σύσταση του οποίου απεικονίζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

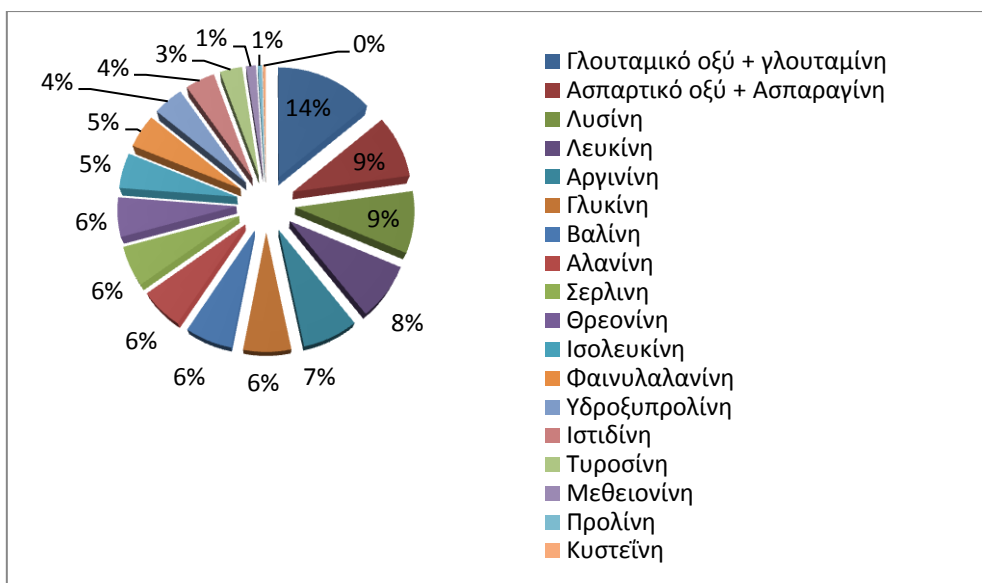
**Πίνακας 2:** Σύσταση ελαίου γιγάρτων (Da Porto et al., 2013).

Λιπαρό οξύ (% w/w)	
Λινελαϊκό	72,35
Ελαϊκό	16,79
Παλμιτικό	7,22
Στεαρικό	3,07
Λινολενικό	0,39
Παλμιτολεϊκό	0,16

Το γιγαρτέλαιο έχει υψηλή θρεπτική αξία λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε λινελαϊκό οξύ (περίπου 72 % (w/w)). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο σε σάλτσες καθώς επίσης και να προστεθεί σε καλλυντικά δεδομένου ότι έχει ενυδατικές ιδιότητες (Da Porto et al., 2013).

### 1.5.6. Πρωτεΐνες

Στα απόβλητα οινοποιίας εντοπίζονται μεγάλα ποσοστά πρωτεΐνης. Έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για την σύσταση των πρωτεϊνών σε στέμφυλα. Συγκεκριμένα οι Valiente et al. (1995) ανέλυσαν την πρωτεΐνη στεμφύλων της λευκής ποικιλίας Airen. Στην πρωτεΐνη, η οποία αποτελούσε το 10,72% w/w επί ξηρών στεμφύλων, εντοπίστηκε ποικιλία αμινοξέων με το γλουταμικό οξύ και τη γλουταμίνη να υπερτερούν. Αναλυτικά η σύσταση της πρωτεΐνης των στεμφύλων φαίνεται στον Σχήμα 2.



**Σχήμα 2:** Σύσταση αμινοξέων σε στέμφυλα της λευκής ποικιλίας Airen (Valiente et al., 1995).

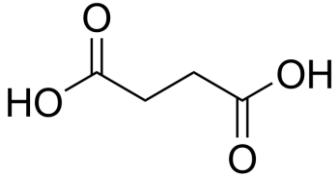
Οι πρωτεΐνες είναι βασικό μέρος της διατροφής των ανθρώπων. Χρησιμοποιούνται ως γαλακτοματοποιητές, αφριστικά μέσα καθώς και για δημιουργία πηκτών gel (ζελατίνη). Μεγάλη προσπάθεια γίνεται για την ανάπτυξη νέων προϊόντων όπως πλαστικών, φιλμς, ινών, κόλλα για κόντρα πλακέ, για επίστρωση χαρτιού και κυρίως από πρωτεΐνες σόγιας και σίτου.

## 1.6. Μικροβιακή παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος

### 1.6.1. Το ηλεκτρικό οξύ

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 12 κορυφαίες υψηλής προστιθέμενης αξίας χημικές ουσίες που παράγονται από βιομάζα σε μια έκθεση που δημοσιεύθηκε από το Υπουργείο Ενέργειας των ΗΠΑ (Werpy et al., 2004). Εντοπίστηκε για πρώτη φορά στο κεχριμπάρι, το οποίο είναι γνωστό ως succinum, που σημαίνει ήλεκτρο στα λατινικά (Koutinas et al., 2014). Είναι διαλυτό στο νερό, την αιθανόλη και την ακετόνη (Cheng et al., 2012). Οι ιδιότητες του ηλεκτρικού οξέος παρατίθενται στον Πίνακα 3 (Perry et al., 1997).

**Πίνακας 3** : Χαρακτηριστικά και ιδιότητες του ηλεκτρικού οξέος (Perry et al., 1997).

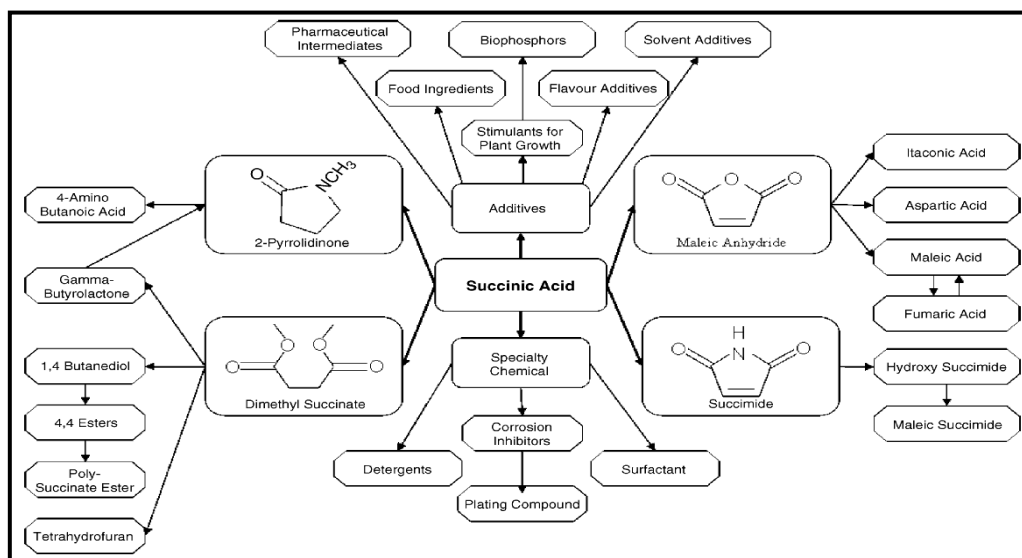
<b>Γενικά Χαρακτηριστικά</b>	
Όνομασία κατά IUPAC	Βουτανιοδιϊκό οξύ
Χημικός τύπος	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
Μοριακό βάρος	118,09 g/mol
Συντακτικός τύπος	
Εμφάνιση	Άχρωμοι κρύσταλλοι σε Κ.Σ.
Σημείο τήξης	187-189°C (460-462 K)
Σημείο βρασμού	235°C (508,15 K)
Ειδικό βάρος	1,56
Διαλυτότητα στο νερό	100 g/100 mL (100 °C) 7,69 g/100 mL (25 °C)
pKa <sub>1</sub>	4,21
pKa <sub>2</sub>	5,64

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). Το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να παραχθεί χημικώς, με διάφορους τρόπους οι οποίοι περιλαμβάνουν κυρίως την οξειδωση της παραφίνης (Zhang & Zang, 2004) και την καταλυτική υδρογόνωση ή ηλεκτραναγωγή του μηλεϊνικού οξέος ή του μηλεϊνικού ανυδρίτη (Muzumdar et al., 2004). Φυσικά 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).

Αν η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος μέσω ζύμωσης ανταγωνιζόταν οικονομικά την παραγωγή του με πρόδρομη ένωση τον μηλεϊνικό ανυδρίτη, τότε θα εφαρμοζόταν η διεργασία της ζύμωσης με χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών και έπειτα το φυσικό ηλεκτρικό οξύ θα είναι η πρόδρομη ένωση για άλλες σημαντικές χημικές ουσίες (McKinlay et al., 2010).

### 1.6.2. Εφαρμογές του ηλεκτρικού οξέος

Το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση πολλών άλλων χημικών ουσιών, χρήσιμων για την βιομηχανία. Έχει ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών εφαρμογών (Σχήμα 3), π.χ. στην παραγωγή βερνικιών και αρωμάτων, βακτηριοστατικών και βιοπολυμερών. Έχει τρία παράγωγα με σημαντικές εφαρμογές που λαμβάνονται μέσω οδών υδρογόνωσης. Αυτά είναι η γ-βουτυρολακτόνη (GBL), η 1,4-βουτανοδιόλη (BDO) και το τετραϋδροφουράνιο (THF). Μια δεύτερη ομάδα μορίων που μπορούν να προέλθουν από το ηλεκτρικό οξύ είναι οι πυρρολιδόνες. Οι εφαρμογές τους βρίσκονται κυρίως σε παραγωγή διαλυτών και στη βιομηχανία πολυμερών. Το φουμαρικό, το μηλικό και το ιτακονικό οξύ αποτελούν μια τρίτη ομάδα των δυνητικών παραγώγων του ηλεκτρικού οξέος. Η χημική μετατροπή του ηλεκτρικού οξέος προς αυτές τις τρεις ενώσεις απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις. Τα υψηλά επίπεδα κατανάλωσης ενέργειας μπορούν να αποφευχθούν με διεργασίες ζυμώσεων καθώς και οι τρεις από αυτές ενώσεις παράγονται φυσικά από μικροοργανισμούς και τα συστήματα παραγωγής τους έχουν αναπτυχθεί για βιομηχανική κλίμακα (Cheng et al., 2012; Guettler et al., 1999; Beauprez et al., 2010).



**Σχήμα 3:** Εφαρμογές του ηλεκτρικού οξέος (Song et Lee, 2006).

### **1.6.3. Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από μικροοργανισμούς**

Το ενδιαφέρον για τις μικροβιακές ζυμώσεις έχει αυξηθεί τελευταία 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).

Όντας ένα βασικό ενδιάμεσο του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA), το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να λειτουργήσει ως ένα τελικό προϊόν ζύμωσης για μια ομάδα βακτηριακών στελεχών όταν η γλυκόζη ή η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα με παροχή διοξειδίου του άνθρακα. Υπάρχουν τρεις διαδρομές για την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος: η αναγωγική πορεία του κύκλου TCA, δηλαδή η ζύμωση (που είναι πιο αποτελεσματική υπό πλήρως αναερόβιες συνθήκες), η οξειδωτική πορεία του κύκλου TCA (που είναι κυρίως υπό αερόβιες συνθήκες) και η οδός του γλυοξυλικού, η οποία είναι ουσιαστικά ενεργή υπό αερόβιες συνθήκες και παράγεται οξικό οξύ. Ανάλογα με τη στοιχειομετρική αφομοίωση του διοξειδίου του άνθρακα και υδρογόνου, η συνολική απόδοση μπορεί να ποικίλει σημαντικά.

Για την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος μέσω αναερόβιας ζύμωσης, η γλυκόζη μετατρέπεται σε ηλεκτρικό οξύ μέσω του αναγωγικού τμήματος του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA). Πρώτα, η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφορική-γλυκόζη καταλυόμενη από το ένζυμο εξωκινάση, 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). Έπειτα το PEP μετατρέπεται σε οξαλοξικό από την PEP καρβοξυκινάση με την προσθήκη CO<sub>2</sub>. Η πορεία της ζύμωσης συνεχίζει με τη μετατροπή του οξαλοξικού σε μηλικό, έπειτα σε φουμαρικό και τέλος σε ηλεκτρικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα προστίθεται υδρογόνου 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. Τέλος, με την προσθήκη υδρογόνου από το ένζυμο φουμαρική αναγωγάση, σχηματίζεται το ηλεκτρικό οξύ στην ιοντική μορφή του, όπου η τιμή pH βρίσκεται πάνω από τις τιμές pKa 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 (Herburn, 2011; McKinlay et al., 2007-a). 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 γλυκόζης (2 mole/mole γλυκόζης), δεδομένου ότι η ροή του άνθρακα οδηγείται προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Zeikus et al., 1999).

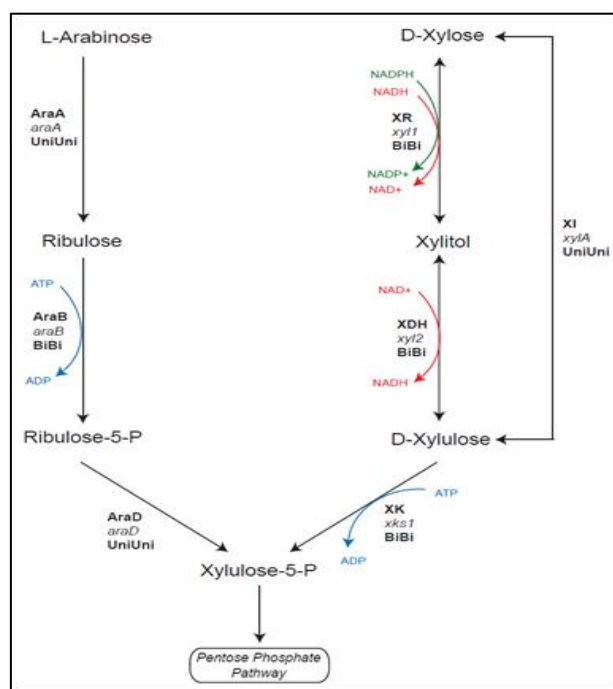
Ωστόσο, αυτή η μέθοδος παραγωγής δεν πραγματοποιείται χωρίς ανεπιθύμητα παραπροϊόντα. Η μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφορική-γλυκόζη λαμβάνει χώρα με την παράπλευρη αντίδραση μετατροπής του PEP σε πυροσταφυλικό, ένα μη αναστρέψιμο στάδιο, παράγοντας στη συνέχεια οξικό, μυρμηκικό, γαλακτικό οξύ και αιθανόλη (McKinlay & Vieille, 2008). Έχει αποδειχθεί βέβαια 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 (Samuelov et al. 1991; Van der Werf et al. 1997).

Ένα ακόμα σημαντικό εμπόδιο για την επίτευξη υψηλής απόδοσης κατά την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος μέσω της αναερόβιας οδού είναι ο περιορισμός των NADH. Η οδός απαιτεί 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 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.

Όσον αναφορά τις πεντόζες, αραβινόζη και ξυλόζη, τα σάκχαρα αυτά μετατρέπονται σε 5-φωσφορική ξυλουλόζη (Σχήμα 4) και μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών ενσωματώνονται στο γλυκολυτικό μονοπάτι EMP

παράγοντας στη συνέχεια ηλεκτρικό οξύ, με τον ίδιο τρόπο που ήδη περιγράφηκε. Το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης αν και παράγει σημαντική αναγωγική ισχύ, η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να δώσει ενέργεια στο κύτταρο, παρέχει μια σειρά μικρών οργανικών ενώσεων, οι οποίες είναι χρήσιμες για τη σύνθεση ριβόζης, πουρινών, συνενζύμων και αρωματικών αμινοξέων. Η 3-φωσφορική γλυκεραλδεύδη, μπορεί να οξειδωθεί και να παράγει ενέργεια με τη μετατροπή της σε πυροσταφυλικό οξύ και με οξείδωση του τελευταίου στον κύκλο του Krebs.

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).



**Σχήμα 4:** Καταβολισμός των πεντοζών, αραβινόζης και ξυλόζης.

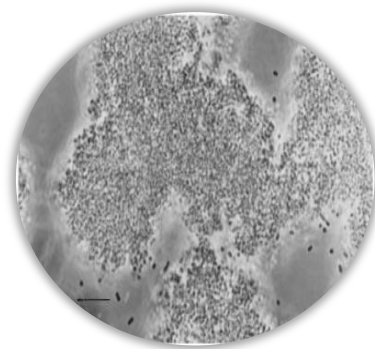
#### **1.6.4. Βακτήρια και υποστρώματα για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος**

Μεταξύ των βακτηρίων που παράγουν ηλεκτρικό οξύ από τα πιο γνωστά και τα οποία έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι ο *Actinobacillus succinogenes* (Guettler et al., 1999), ο *Anaerobiospirillum succinoproducens* (Lee et al., 2010) και ο *Mannheimia succiniciproductens* (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). Το ηλεκτρικό οξύ που παράγεται στη μεγάλη κοιλία από τα υπάρχοντα βακτήρια λειτουργεί ως μία σημαντική πρόδρομη ένωση για το σχηματισμό προπιονικού οξέος. 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 (Jantama et al., 2008).

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). Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες πηγές άνθρακα όπως το άχυρο (Zheng et al., 2009), το καλαμπόκι (Chen et al., 2010), το τυρόγαλα (Wan et al., 2008), το σιτάρι (Dorado et al., 2009), και η μελάσα από ζαχαροκάλαμο (Liu et al., 2008), το σύνολο των οποίων θα μπορούσε να υδρολύεται και να προκύπτει μίγμα σακχάρων.

#### **1.6.5. *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 5). Το βακτήριο αυτό απομονώθηκε από τη μεγάλη κοιλία βοοειδών στο Ινστιτούτο Βιοτεχνολογίας του Μίσιγκαν (Michigan Biotechnology Institute-MBI) από τους Guettler et al. (1999).



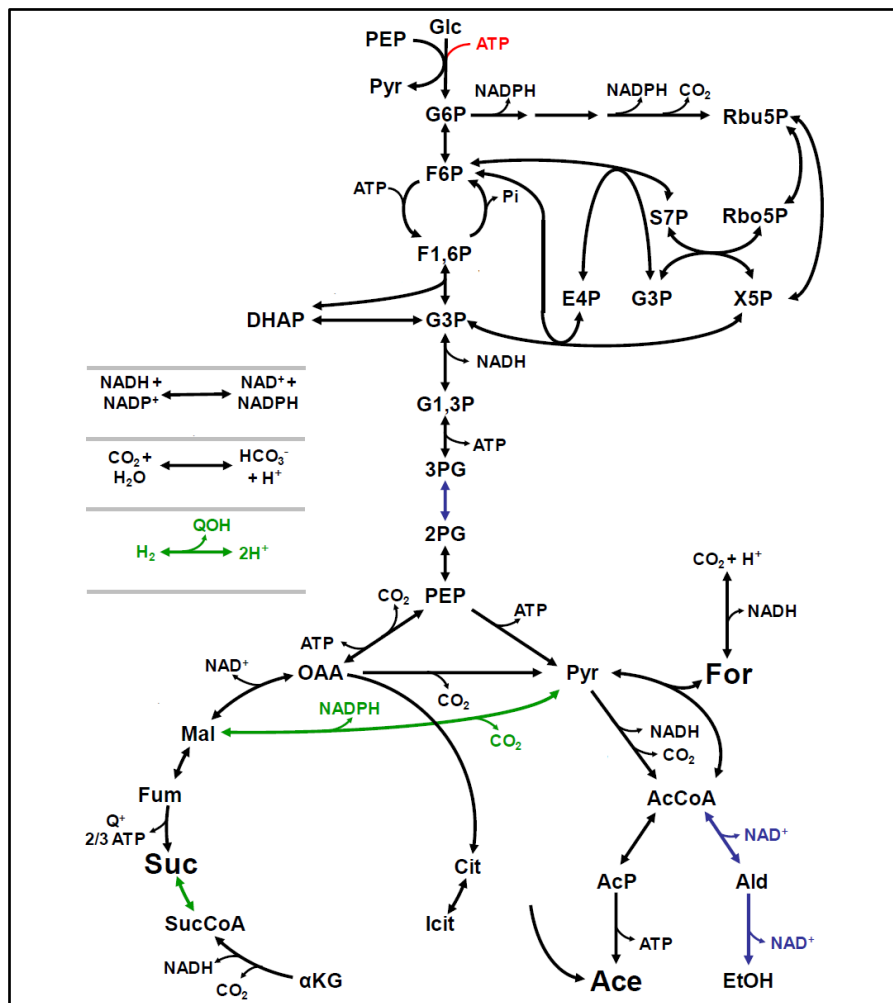
**Εικόνα 5:** *Actinobacillus succinogenes* στέλεχος 130Z αναπτυγμένο σε άγαρ TSB (Guettler et al., 1999).

Είναι πολυμορφικό, χημειο-οργανότροφο, προαιρετικά αναερόβιο, καπνόφιλο, με μη κινητικά ραβδία διαμέτρου  $0,8 \times 1 \mu\text{m}$  και gram-αρνητικό βακτήριο. Οι αποικίες του έχουν διάμετρο 1-1,5  $\mu\text{m}$ , 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). Οι Guettler et al. (1999) έχουν αναφέρει ότι σε σύγκριση με άλλα βακτήρια που παράγουν ηλεκτρικό οξύ, ο *A. succinogenes* παρήγαγε τις μεγαλύτερες ποσότητες (Samuelon et al., 1991). Εκτός από την υψηλή ανοχή του στα προϊόντα, ο *A. succinogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε μια ευρεία ποικιλία πηγών άνθρακα. 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.

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).

Το βακτήριο *A. succinogenes* ακολουθεί το βιοχημικό μονοπάτι (Σχήμα 5) που όπως περιγράφηκε και από το κεφάλαιο 1.6.3. η 6-φωσφορική γλυκόζη καταβολίζεται σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκόλυσης EMP αλλά

και με μικρή συμμετοχή στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Τέλος, οι μελέτες των McKinley et al. (2010) έδειξαν πως δεν ακολουθεί την βιοχημική οδό Entner-Doudoroff και τον κύκλο του γλυκοξυλικού οξέος.



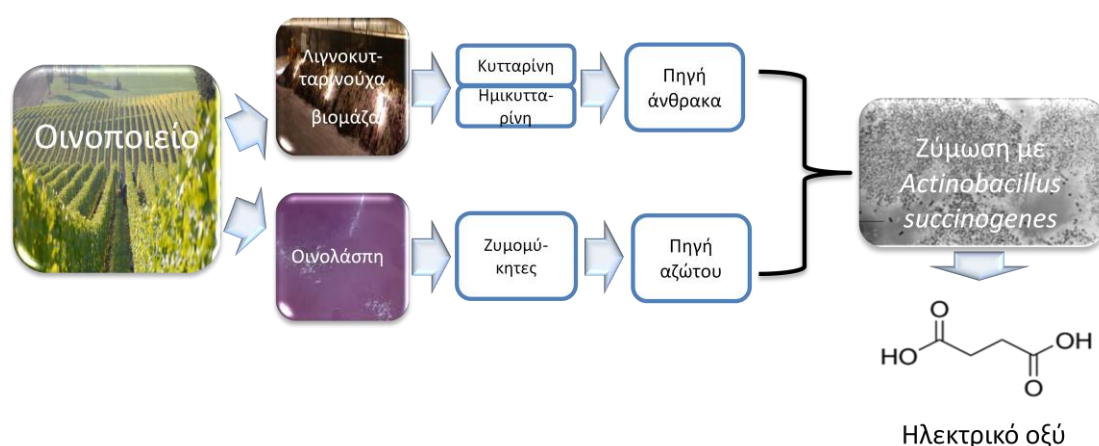
**Σχήμα 5:** Βιοχημικό μονοπάτι μεταβολισμού της γλυκόζης του βακτηρίου *Actinobacillus succinogenes* (McKinley et al., 2010).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην κατά το δυνατόν πληρέστερη αξιοποίηση των παραπροϊόντων της διαδικασίας της οινοποίησης, για την ανάκτηση εμπορεύσιμων συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας (φαινολικές ενώσεις, διαιτητικές ίνες, λιπαρές ύλες, τρυγικό οξύ) και την περαιτέρω χρήση των υδρολυμένων μονοσακχαριτών από βοστρύχους, στέμφυλα και γίγαρτα και υδρόλυμα οινολάσπης ως θρεπτικό μέσο για τη μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Για το σκοπό αυτό επιγραμματικά ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα (Σχήμα 6):

- ❖ Φυτικοχημική ανάλυση των λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων οινοποιείου (υπολείμματα στεμφύλων και γιγάρτων καθώς και βόστρυχοι) για τον ακριβή προσδιορισμό της περιεκτικότητάς τους.
- ❖ Χημικές και βιολογικές υδρολύσεις των λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων προς υδρολύματα πλούσια σε σάκχαρα.
- ❖ Ενζυμική υδρόλυση των ζυμών της οινολάσπης.
- ❖ Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με υπόστρωμα τα επεξεργασμένα απόβλητα οινοποιείου με τη χρήση του βακτηρίου *Actinobacillus succinogenes*.

Η μελέτη αυτή αξιολογεί τις δυνατότητες ανάπτυξης ενός σύγχρονου βιοδυλιστηρίου αξιοποιώντας απόβλητα οινοποιείου για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος καθώς και άλλων προϊόντων προστιθέμενης αξίας.



**Σχήμα 6:** Επιγραμματική πορεία διεργασίας από τα απόβλητα οινοποιείου σε τελικό προϊόν το ηλεκτρικό οξύ.

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1. Πρώτη ύλη**

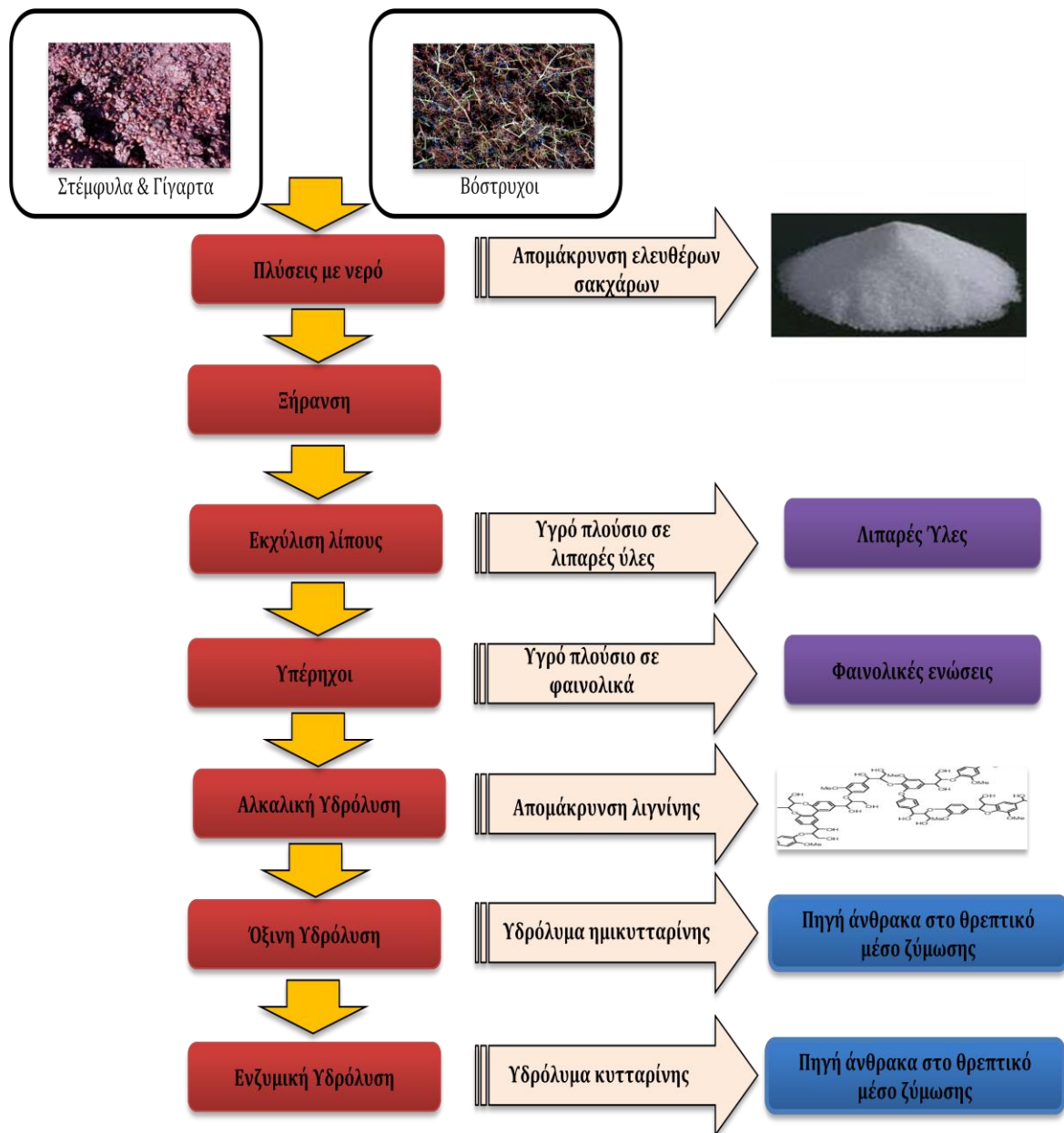
Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν βόστρυχοι, στέμφυλα και γίγαρτα καθώς και οινολάσπη της ποικιλίας Αγιωργίτικο (Νεμέα, Κόρινθος, Ελλάδα), τα οποία προμηθεύτηκαν από το εργαστήριο της Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι βόστρυχοι πάρθηκαν έπειτα από την αποβοστρύχωση. Τα υπολείμματα στεμφύλων και γιγάρτων συλλέχθηκαν μετά το πέρας μιας βδομάδας εκχύλισης συστατικών από το υδρο-αλκοολικό διάλυμα που προκύπτει κατά την αλκοολική ζύμωση, έπειτα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία  $-4^{\circ}\text{C}$ . Η οινολάσπη συλλέχθηκε μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$ .

Ακολουθήθηκαν δυο διαφορετικές διεργασίες:

- Η πρώτη αφορούσε την επεξεργασία των λιγνοκυτταρινούχων (βόστρυχοι, στέμφυλα και γίγαρτα), το υδρόλυμα των οποίων αποτέλεσε την πηγή άνθρακα για τη ζύμωση.
- Η δεύτερη αφορούσε την επεξεργασία της οινολάσπης, το υδρόλυμα της οποίας αποτέλεσε την πηγή αζώτου για την ζύμωση.

#### **3.2. Επεξεργασία και αναλύσεις της λιγνοκυτταρινούχας ύλης**

Τα λιγνοκυτταρινούχα (στέμφυλα, γίγαρτα και βόστρυχοι) που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη προέκυψαν από ερυθρή οινοποίηση σταφυλιών ποικιλίας Αγιωργίτικου Νεμέας, και προτού χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα μικροβιακής ζύμωσης προηγήθηκε μια σειρά επεξεργασιών (Σχήμα 7), κυρίως εκχυλίσεις φαινολικών ενώσεων και λιπαρών υλών και έπειτα ακολούθησε μια σειρά υδρολύσεων με σκοπό την απόκτηση τελικού υδρολύματος μονοσακχαριτών που χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο για τη μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.



**Σχήμα 7:** Διάγραμμα ροής επεξεργασίας στεμφύλων, γιγάρτων και βοστρύχων.



### 3.2.1. Προσδιορισμός υγρασίας

Αρχή της μεθόδου: Στηρίζεται στην εύρεση επί τοις % απώλειας του βάρους του δείγματος με την ξήρανσή του βάσει της παραδοχής ότι όλη η απώλεια του βάρους οφείλεται στην απομάκρυνση της υγρασίας του.

Τα δείγματα ζυγίστηκαν ξεχωριστά σε αναλυτικό ζυγό (Mettler Toledo), έπειτα ξηράνθηκαν σε φούρνο (Memmert) σε θερμοκρασία 60 °C για 24 ώρες, τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα έτσι ώστε η θερμοκρασία του δείγματος να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό. Η υγρασία υπολογίζεται από την *Εξίσωση 1*:

$$\% \text{ Υγρασία} = \frac{(\text{Νωπό δείγμα (g)} - \text{Ξηρό δείγμα (g)})}{\text{Νωπό δείγμα (g)}} * 100 \text{ (Εξίσωση 1)}$$

Μετά την απομάκρυνση της υγρασίας, πραγματοποιήθηκε άλεση των δειγμάτων σε μίξερ και έπειτα ακολούθησαν περαιτέρω αναλύσεις.

### 3.2.2. Προσδιορισμός τέφρας

Αρχή της μεθόδου: το υπόλειμμα που παραμένει μετά την πλήρη καύση των οργανικών συστατικών ενός δείγματος. Η πλήρης καύση πραγματοποιήθηκε σε φούρνο (Vulkan) θερμοκρασίας 550-600°C.

Το δείγμα ξηραίνεται στους 60°C (Memmert) για 24 ώρες μέχρι απώλεια υγρασίας, τοποθετείται έπειτα στον ξηραντήρα και όταν το δείγμα βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό (Mettler Toledo). Χρησιμοποιείται προαποτεφρωμένη κάψα και ζυγισμένη σε θερμοκρασία δωματίου σε αναλυτικό ζυγό (Mettler Toledo). Το ποσοστό της τέφρας υπολογίζεται από την *Εξίσωση 2*.

$$\% \text{ Τέφρα} = \left( \frac{\text{Κάψα με τέφρα (g)} - \text{Κάψα (g)}}{\text{Ξηρό δείγμα (g)}} \right) * 100 \text{ (Εξίσωση 2)}$$

### **3.2.3. Απομάκρυνση ελευθέρων σακχάρων**

Τα αλεσμένα δείγματα αναδεύτηκαν με νερό σε αναλογία 1:10 w/v (στερεό:νερό) για 24 ώρες, σε 25 °C και στη συνέχεια το νερό ανανεώθηκε και συνέχισε η ανάδευση στις ίδιες συνθήκες για 24 ώρες. Το νερό με τα ελεύθερα σάκχαρα έπειτα αναλύθηκε και το στερεό ξηράνθηκε σε φούρνο σε θερμοκρασία 60 °C για 24 ώρες.

### **3.2.4. Εκχύλιση λιπαρών υλών**

Η εκχύλιση λιπαρών υλών πραγματοποιήθηκε με δυο τρόπους. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Soxhlet με σκοπό τον ποσοτικό υπολογισμό των ολικών λιπαρών υλών των δειγμάτων και ενώ για εκχύλιση λίπους σε μεγαλύτερες ποσότητες δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το εξάνιο.

#### Αντιδραστήρια

Για την μέθοδο Soxhlet χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο διαιθυλαιθέρας (Sigma-Aldrich) ενώ για την εκχύλιση λιπαρών υλών με εξάνιο, χρησιμοποιήθηκε εξάνιο (Sigma-Aldrich).

#### Προετοιμασία δείγματος

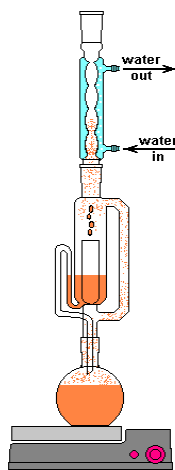
Χρησιμοποιούμε ξηρό δείγμα για να εισχωρήσει ο οργανικός διαλύτης και να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των λιπαρών υλών. Ο οργανικός διαλύτης και το νερό είναι μη αναμίξιμα μέσα, επομένως η παρουσία του νερού θα προκαλούσε παρεμπόδιση της εκχύλισης.

#### **3.2.4.1. Μέθοδος Soxhlet**

Αρχή της μεθόδου: Σταθμική μέθοδος κατά την οποία το λίπος παραλαμβάνεται με συστηματική εκχύλιση ξηράς ύλης.

### Περιγραφή της μεθόδου

Η μέθοδος είναι ημισυνεχής εκχύλιση λίπους κατά την οποία 3-5 g του προς εκχύλισιν ξηρού στερεού τοποθετείται σε ειδικό πορώδη χάρτινο υποδοχέα (φύσιγγα) προζυγισμένο. Σε προζυγισμένη φιάλη προστέθηκε ο διαιθυλαιθέρας, όπου είναι ο διαλύτης. Οι ατμοί του ζέοντος διαλύτη διέρχονται από τον πλευρικό υάλινο σωλήνα του επιθέματος, συμπυκνώνονται στον ψυκτήρα και επαναρρέουν επί του χάρτινου υποδοχέα του στερεού μίγματος στον εκχυλιστήρα. Όταν ο χώρος στον εκχυλιστήρα πληρωθεί με διαλύτη μέχρι του ύψους του κεκαμένου πλευρικού απαγωγού σωλήνα, γίνεται αυτόματος σιφωνισμός και ο διαλύτης (εκχύλισμα) επαναρρέει στη φιάλη Α και ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εμπλουτισμός του διαλύματος στη φιάλη με τα διαλυτά συστατικά του στερεού μίγματος (Εικόνα 6). Η εκχύλιση διαρκεί περίπου πέντε ώρες. Το λίπος εκφράζεται ως % w/w.



**Εικόνα 6:** Διάταξη εκχύλισης λιπαρών υλών με τη μέθοδο Soxhlet.

#### **3.2.4.2. Εκχύλιση λιπαρής ύλης με εξάνιο**

Τα αλεσμένα ξηρά δείγματα αναμίχθηκαν με εξάνιο σε αναλογία 1:10 w/v (στερεό:νερό) για 1,5 ώρες, στους 25 °C και ο διαλύτης μαζί με τις εκχυλισμένες λιπαρές ύλες συλλέχθηκαν με διήθηση με απλό ηθμό.

#### Ανάκτηση λιπαρών υλών

Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης των λιπαρών υλών, ο διαλύτης με τις λιπαρές ύλες που εκχυλίστηκαν, μεταφέρθηκαν σε στεγνή και προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης των 500 mL. Με περιστροφική εξάτμιση υπό κενό στους 40 °C (Büchi

Waterbath B-480) ανακτήθηκε ο διαλύτης και οι λιπαρές ύλες 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. Τέλος υπολογίστηκε το ποσοστό της λιποπεριεκτικότητας από τις *Εξισώσεις 3, 4*.

Τελικό υποδοχέα (μεικτό βάρος) - αρχικό υποδοχέα (απόβαρο φιάλης) = g ελαίου  
(Εξίσωση 3)

Λιποπεριεκτικότητα % =  $\left(\frac{100 * \text{g ελαίου}}{\text{g ξηρού δείγματος}}\right)$  (Εξίσωση 4)

### 3.2.5. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών

#### Αντιδραστήρια

Για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών χρησιμοποιήθηκαν HCl 0,1M (Sigma-Aldrich) και 70% v/v αιθανόλη (Sigma-Aldrich). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (MeOH) αναλυτικής καθαρότητας (Sigma-Aldrich) για να επαναδιαλυθούν τα φαινολικά συστατικά μετά από την ανάκτηση του διαλύτη.

#### 3.2.5.1. Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη και υπερήχους

Η εκχύλιση είναι μια από τις συνηθισμένες τεχνικές διαχωρισμού φαινολικών ενώσεων. Βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων που πρακτικά δεν αναμειγνύονται ή αναμειγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους.

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους επιτυγχάνει μια μείωση στη χρήση διαλυτών και επιταχύνει τη διαδικασία της εκχύλισης. Η χρήση των υπερήχων στην εκχύλιση στηρίζεται στο φαινόμενο της ταλάντωσης που προκαλεί η πηγή των υπερήχων, στα μόρια του υλικού με το οποίο έρχεται σε επαφή. Παρατηρείται μεταβολή της πίεσης του διαλύτη, που οδηγεί στη δημιουργία και κατάρρευση φυσαλίδων. Συνέπεια της αναταραχής αυτής στο διαλύτη είναι η διάβρωση σε μεγάλο βαθμό του στερεού φυτικού ιστού του δείγματος, με αποτέλεσμα την καλύτερη

διείσδυση του διαλύτη στον ιστό και αποικοδόμηση των πολυμερών που αυτός παρέχει.

### Περιγραφή της εκχύλισης

Ξηρό δείγμα αναμείχθηκε με 70% αιθανόλη και 0,5% 0,1N HCl σε αναλογία στερεού: υγρού/ 1:30 w/v, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υπερήχους (Ultrasonic, Elma S 70) για 20 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό και στο στερεό επαναλήφθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία ανανεώνοντας κάθε φορά το διαλύτη για την πληρέστερη εκχύλιση των φαινολικών, και στα τρία στάδια προστέθηκε ο ίδιος όγκος διαλύτη.

Ο διαλύτης με τα φαινολικά που εκχυλίστηκαν, από τις τρεις εκχυλίσεις, 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 τυλίχθηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα στον οποίο παρέμεινε για περίπου 12-15 h. Ακολούθησε ζύγιση της φιάλης και τα φαινολικά συστατικά συλλέχθηκαν επαναδιαλύοντάς τα σε μεθανόλη (Negro et al., 2003).

### **3.2.5.2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων (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.

### Αντιδραστήρια

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% (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%), το οποίο είναι σταθερό για αρκετές ημέρες.

Αρχή της μεθόδου: βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων με ταυτόχρονη αναγωγή του διαλύματος φωσφορομολυβδενικού (3H<sub>2</sub>O · P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> · 13WO<sub>3</sub> · 5MoO<sub>3</sub> · 10H<sub>2</sub>O) και φωσφοροβολφραμικού οξέος

$(3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O})$  (αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu) σύμπλοκο, μπλε χρώματος σε αλκαλικό περιβάλλον (Ciccio et al., 2009). Η ένταση του κυανού χρώματος προσδιορίζεται με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου υπεριώδους - ορατού (UV-vis) (Spectrophotometer, Hitachi U-2000) διπλής δέσμης και μέτρηση της απορρόφησης στα 765 nm και είναι ανάλογη των ολικών φαινολικών συστατικών (Faustino et al., 2010).

#### Περιγραφή της μεθόδου

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.

Στην ποσότητα φαινολικών που εκχυλίστηκε από 10 g ξηρού δείγματος λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων οινοποιείου προστέθηκαν 10 mL μεθανόλης. Από αυτό το διάλυμα μεταφέρθηκε με χρήση μηχανικής πιπέτας κατάλληλη ποσότητα σε δοκιμαστικούς σωλήνες για να παρασκευαστούν οι αραιώσεις 1:5, 1:10 και 1:20 με μεθανόλη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση των διαλυμάτων με χρήση Vortex.

50  $\mu\text{L}$  από τα πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος και 50  $\mu\text{L}$  από τις αραιώσεις του εκχυλίσματος (δείγμα) μεταφέρθηκαν σε αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκαν 450  $\mu\text{L}$  απιονισμένο  $\text{H}_2\text{O}$  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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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  $\mu\text{L}$  δείγμα προστέθηκαν 50  $\mu\text{L}$  απιονισμένο νερό (τυφλό).

Η συγκέντρωση του δείγματος σε γαλλικό οξύ υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε g/L. Η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών. Ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων έγινε με τη χρήση της εξίσωσης:  $y = 0,9596 * x - 0,0455$  με συντελεστή προσδιορισμού  $R^2=0,999$  (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/L.

### **3.2.5.3. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών συστατικών (DPPH)**

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλίσματος είτε φυτού είτε αποβλήτου μπορεί να εκτιμηθεί με τη μέθοδο της DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζυλική 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).

#### Αντιδραστήρια

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

Αρχή της μεθόδου: Η μέθοδος DPPH βασίζεται στην ικανότητα της σταθερής ελεύθερης ρίζας 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλ-υδραζίλιο (DPPH•) να αντιδρά με αντιοξειδωτικές ενώσεις.

## Περιγραφή μεθόδου

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 (Gaderli *et al.*, 2008)

## Προετοιμασία διαλύματος DPPH

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL προετοιμάστηκε διάλυμα DPPH συγκέντρωσης 81,2  $\mu\text{M}$  (32  $\mu\text{g/mL}$ ) 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 όπως περιγράφηκε παραπάνω για τον καθορισμό του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας (AAI). Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις για το δείγμα ώστε οι απορροφήσεις να δίνουν τιμές I% μικρότερη και μεγαλύτερη του 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. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν εις διπλούν. Τα διαλύματα παρέμειναν σε ηρεμία και σε σκοτεινό χώρο για 90 λεπτά. Κατόπιν μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος αναφοράς, των δειγμάτων και των προτύπων στο φασματοφωτόμετρο διπλής θέσεως (Hitachi U-2000) σε μήκος κύματος 517 nm, χρησιμοποιώντας τις πλαστικές κυψελίδες των 1,5 mL.



Αρχικά το ποσοστό αναστολής της δραστηριότητας της ρίζας DPPH υπολογίζεται από την *Εξίσωση 5*:

$$I\% = \frac{(Abs_0 - Abs_1)}{Abs_0} * 100 \text{ (Εξίσωση 5)}$$

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). 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 δραστηριότητας της DPPH,  $I\%$  (Faustino et al., 2010). Οπότε η σχέση που προκύπτει από τη γραφική παράσταση, από δύο τιμές εκατέρωθεν του  $I\%=50$ , έστω  $I_1$  και  $I_2$ , είναι η *Εξίσωση 6*:

$$IC_{50} (\mu\text{g/mL}) = \frac{C_1 \cdot (50 - I\%_2) - C_2 \cdot (50 - I\%_1)}{I\%_1 - I\%_2} * 1000 \text{ (Εξίσωση 6)}$$

Όπου  $C_1$  και  $C_2$  είναι οι συγκεντρώσεις στις κυψελίδες σε g/L.

Για τα εκχυλίσματα φυτών ή καθαρών ενώσεων τα δεδομένα που παρουσιάζονται, όπως το  $I\%$  ή η τιμή  $IC_{50}$ , αλλάζουν ανάλογα με την τελική συγκέντρωση της DPPH που χρησιμοποιήθηκε. Ως εκ τούτου, οι Scherer και Godoy (2009) πρότειναν ένα νέο δείκτη αντιοξειδωτική δραστηριότητας (antioxidant activity index, AAI) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DPPH. Ο δείκτης αντιοξειδωτική δραστηριότητας (AAI), υπολογίζεται από την *Εξίσωση 7*.

$$AAI = \frac{\text{Τελική συγκέντρωση της DPPH σε } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}}{IC_{50} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})} \text{ (Εξίσωση 7)}$$

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.

### **3.2.6. Προσδιορισμός αδιάλυτων διαιτητικών ινών**

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζονται οι διαιτητικές ίνες οι οποίες είναι αδιάλυτες στο νερό. Ως διαιτητικές ίνες αδιάλυτες στο νερό ορίζεται το ελεύθερο τέφρας αδιάλυτο οργανικό υπόλειμμα που παραμένει μετά την εν θερμώ κατεργασία του αναλυτικού δείγματος με οξέα, βάσεις ή οργανικούς διαλύτες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η κυτταρίνη, οι ημικυτταρίνες (πολυμερή πεντοζών), η ινουλίνη (πολυμερές της φρουκτόζης) και οι λιγνίνες (μη υδατανθρακικά παράγωγα). Ο προσδιορισμός των φυτικών ινών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Weende, η οποία χρησιμοποιείται από πολύ παλιά σε αναλύσεις ζωοτροφών. Χρειάζεται να αναφερθεί ότι αυτή η διαδικασία μειονεκτεί καθώς έχει πολύ μεγάλο σφάλμα μέτρησης. Μέσω αυτής της μεθόδου προσδιορίζονται με επιτυχία κατά 20-30%, 50-80% και 10-50% τα συστατικά ημικυτταρίνη, κυτταρίνη και λιγνίνη αντίστοιχα. Παρ' όλ' αυτά λόγω της μακράς ιστορίας αυτής της μεθόδου χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα.

Αρχή της μεθόδου: Το ελεύθερο τέφρας αδιάλυτο οργανικό υπόλειμμα που παραμένει μετά την εν θερμώ κατεργασία του αναλυτικού δείγματος με οξέα, βάσεις ή οργανικούς διαλύτες.

#### Αντιδραστήρια

Για τον προσδιορισμό των διαιτητικών ινών τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25% (Sigma-Aldrich), NaOH 1,25% (Sigma-Aldrich) και ακετόνη 70% (Sigma-Aldrich). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κάψουλες FiberCap και το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Foss Cyclotec 1093.

### Περιγραφή της μεθόδου

Το δείγμα να είναι ξηρό και αλεσμένο και σε περίπτωση που έχει λιποπεριεκτικότητα μεγαλύτερη από 10% να έχει γίνει εκχύλιση λιπαρών υλών του δείγματος. Αρχικά ζυγίζεται η μάζα της κάψουλας με καπάκι σε αναλυτικό ζυγό (Mettler Toledo) και έπειτα προστίθεται περίπου 1 g δείγματος με ακρίβεια  $\pm 0,1$  mg σε αναλυτικό ζυγό (Mettler Toledo) και τοποθετείται σε ειδική διάταξη. Για το δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται κενή κάψουλα. Σε ποτήρι προστίθενται 350 mL  $H_2SO_4$  1,25%, τοποθετείται σε θερμοαντική πλάκα και όταν το διάλυμα έρθει σε βρασμό, τοποθετούνται τα δείγματα, μειώνεται η ένταση βρασμού και αφήνονται για 30 λεπτά. Το ποτήρι έπειτα αδειάζει και προστίθεται διάλυμα NaOH 1,25% και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία. Στη συνέχεια τα δείγματα ξεπλένονται 2 φορές με 350 mL  $H_2O$  και ακολουθεί πλύση το δειγμάτων με 120 mL ακετόνης. Οι κάψουλες τοποθετούνται σε φούρνο (Memmert) στους  $150 \pm 2$  °C για 5 ώρες και έπειτα ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό (Mettler Toledo) ύστερα από 30 λεπτά ξήρανσης σε ξηραντήρα. Τέλος οι κάψουλες τοποθετούνται σε προζυγισμένες κάψες και καίγονται σε κλίβανο στους  $600 \pm 100$  °C για 4 ώρες. Οι αποτεφρωμένες κάψουλες αφού παραμείνουν σε ξηραντήρα για 1 ώρα ζυγίζονται με ακρίβεια  $\pm 0,1$  mg σε αναλυτικό ζυγό (Mettler Toledo). Το ποσοστό των αδιάλυτων ινών υπολογίζεται από την *Εξίσωση 8*.

$$\% \text{Αδιάλυτες Ίνες} = 100 * \frac{w_3 - (w_1 * C) - (w_5 - w_4 - D)}{w_2} \text{ (Εξίσωση 8)}$$

Όπου :

w1: το αρχικό βάρος της κάψουλας (mg)

w2: το βάρος του δείγματος (mg)

w3: το βάρος του δείγματος και της κάψουλας μετά την ξήρανση (mg)

w4: το βάρος του χωνευτηρίου (mg)

w5: το βάρος της τέφρας (mg)

C: συντελεστής διόρθωσης (=0,999)

D: το βάρος της τέφρας που προέρχεται από την κάψουλα (mg) (=3 mg)

### 3.2.7. Προσδιορισμός περιεκτικότητας λιγνοκυτταρινούχων

Στον ποιοτικό έλεγχο των ζωοτροφών χρησιμοποιούνται οι όροι “Acid Detergent Fibre” και “Neutral Detergent Fibre” και αποτελούν δείκτες της πρόσληψης ενέργειας μέσω της διατροφής, ειδικά σε μηρυκαστικά θηλαστικά. Τα συστατικά των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κλάσματα ανάλογα με τη ικανότητα χώνευσης τους με απορρυπαντικά: 1) αυτά που δεν χωνεύονται εύκολα (ημικυτταρίνες, κυτταρίνη, λιγνίνη) και 2) ουσίες που χωνεύονται εύκολα (π.χ άμυλο και σάκχαρα). Η τιμή της ADF αποτελεί δείκτη των αδιάλυτων συστατικών (κυτταρίνη, λιγνίνη) έπειτα από επεξεργασία με όξινο διάλυμα απορρυπαντικού. Όσο αυξάνει η τιμή της, τόσο δυσκολότερα θα χωνευθεί η ζωοτροφή. Η τιμή NDF αποτελεί το σύνολο των κυτταρικών τοιχωμάτων και συνίσταται από το κλάσμα της ADF και τις ημικυτταρίνες. Όσο αυξάνει η τιμή της, τόσο λιγότερη ζωοτροφή θα καταναλωθεί από το ζώο. Τέλος η τιμή ADL (“Acid Detergent Lignin”) αποτελεί δείκτη της λιγνίνης.

Η μέθοδος προτάθηκε αρχικά για ζωοτροφές αλλά εφαρμόζεται και σε τρόφιμα κυρίως ολικής αλέσεως. Η όξινη υδρόλυση με  $H_2SO_4$  παρουσία βρωμιούχου N-δεκαεξυλο-N,N,N-τριμεθυλο-αμμώνιο γίνεται για την καταβύθιση πρωτεϊνών και την απομάκρυνση απλών σακχάρων και αμύλου.



**Εικόνα 7:** Συσκευή προσδιορισμού κυτταρίνης-λιγνίνης.

Σύμφωνα με τις παρακάτω μεθόδους:

- Επίσημη Γερμανική Μέθοδος: Methodenbuch des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, Band III, Bestimmung der Säure-Detergentien-Faser (ADF)
- Επίσημη μέθοδος AOAC 973.18, Fiber (Acid Detergent) and Lignin ( $H_2SO_4$ ) in Animal Feed, First Action 1973, Final Action 1977
- EN ISO 13906:2008, Animal feeding stuffs – Determination of acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL) contents – [www.iso.org/www.cen.eu](http://www.iso.org/www.cen.eu)

#### Αντιδραστήρια

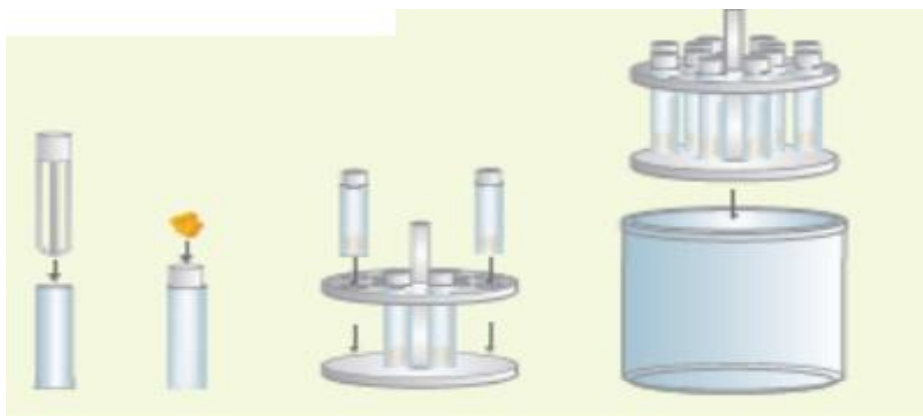
- Διάλυμα όξινου απορρυπαντικού ή διάλυμα ADF : 20 g βρωμιούχο N-δεκαεξυλο-N,N,N-τριμεθυλο-αμμώνιο αραιώνονται σε 1L θεικού οξέος C ( $H_2SO_4$ ) = 0,5 mol/L. Το διάλυμα πρέπει να αποθηκεύεται στο σκοτάδι στους 18 με 20 °C
- Αντι-αφριστικός παράγοντας : δεκαϋδρονάφθαλνιο (δεκαλίνη) (Προσοχή! Κατά την αποθήκευση παρουσία οξυγόνου, σχηματίζει εκρηκτικά υπεροξειδία)

Αρχή της μεθόδου NDF: Το μέρος των συστατικών του φυτικού υλικού τα οποία δεν απομακρύνονται (“eluted”) από ένα ουδέτερο απορρυπαντικό (neutral detergent), όπως περιγράφεται παρακάτω αποτελεί τις ίνες ουδέτερου απορρυπαντικού (NDF). Στις ζωοτροφές φυτικής προέλευσης, το περιεχόμενο της NDF υποδεικνύει το τμήμα της ημικυτταρίνης, κυτταρίνης, λιγνίνης και αζωτούχων ενώσεων λιγνίνης. Μετά την έκπλυση, με τη χρήση ουδέτερου απορρυπαντικού, το αδιάλυτο υπόλειμμα ξηραίνεται, ζυγίζεται, και κατόπιν αποτεφρώνεται. Η διαφορά μεταξύ της περιεκτικότητας σε τέφρα και του ξηρού διάλυτου υπολείμματος είναι η περιεκτικότητα σε NDF. Η διαδικασία της διάλυσης και της διήθησης απλοποιείται με τη χρήση των FibreBags. Το πιο σημαντικό μέρος στην ανάλυση ινών είναι ο χρόνος έκπλυσης και η ακρίβεια της ζύγισης.

Αρχή της μεθόδου ADF: Το μέρος των συστατικών του φυτικού υλικού τα οποία δεν απομακρύνονται (“eluted”) από ένα όξινο απορρυπαντικό (acid detergent), όπως περιγράφεται παρακάτω αποτελεί τις ίνες όξινου απορρυπαντικού (ADF). Στις ζωοτροφές φυτικής προέλευσης, το περιεχόμενο της ADF υποδεικνύει το τμήμα της κυτταρίνης, λιγνίνης και αζωτούχων ενώσεων λιγνίνης. Μετά την έκπλυση, με τη χρήση όξινου απορρυπαντικού, το αδιάλυτο υπόλειμμα ξηραίνεται, ζυγίζεται, και κατόπιν αποτεφρώνεται. Η διαφορά μεταξύ της περιεκτικότητας σε τέφρα και του ξηρού αδιάλυτου υπολείμματος είναι η περιεκτικότητα σε ADF. Η διαδικασία της διάλυσης και της διήθησης απλοποιείται με τη χρήση των FibreBags. Το πιο σημαντικό μέρος στην ανάλυση ινών είναι ο χρόνος έκπλυσης και η ακρίβεια της ζύγισης.

#### Πειραματική πορεία

- Σε φούρνο θερμοκρασίας  $105 \pm 1$  ° C για 1 ώρα ξηραίνεται ο απαραίτητος αριθμός των FibreBags. Το βάρος των FibreBags είναι η τιμή  $m_1$  για το πρωτόκολλο ζύγισης. Στη συνέχεια τα FibreBags αποθηκεύονται σε ξηραντήρα μέχρι τη χρήση τους.
- Το βάρος του δείγματος που πρόκειται να τοποθετηθεί στα FibreBags θα πρέπει να είναι 1 g (ζύγιση με ακρίβεια 1 mg), τιμή  $m_2$ .
- Η τιμή του τυφλού, καθορίζεται παράλληλα με την ανάλυση των δειγμάτων (FibreBag χωρίς δείγμα). Θα πρέπει να είναι  $<1$  mg/FibreBag. Αρκεί να καθοριστεί μία τιμή ανά πακέτο FibreBags.
- Τα γυάλινα διαχωριστικά εισέρχονται στα FibreBags. Και τα δύο μαζί τοποθετούνται στο καρουσέλ (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8:** Προετοιμασία δείγματος και τοποθέτηση στο καρουσέλ.

360 ml διαλύματος ADF μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως. Προστίθενται πέτρες βρασμού και ως αντι-αφριστικός παράγοντας δεκαϋδρόναφθαλένιο. Το εργαλείο χειρισμού συνδέεται στο καρουσέλ και τοποθετείται προσεκτικά στο ποτήρι ζέσεως (Εικόνα 8) που περιέχει το διάλυμα ADF. Το καρουσέλ περιστρέφεται για περίπου 1 λεπτό, μέχρις ότου τα FibreBags διαβραχούν και γεμίσουν πλήρως με το διάλυμα. Κατόπιν το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται στην προθερμασμένη εστία, η οποία αρχικά ρυθμίζεται σε λειτουργία μέγιστης ισχύς (για περίπου 3 - 5 λεπτά). Μόλις το διάλυμα αρχίσει να βράζει μειώνεται η ισχύς της θέρμανσης. Το δείγμα αφήνεται σε ομαλό βρασμό για 60 min, παράλληλα τα δείγματα πρέπει να επιπλέουν ελεύθερα στα FibreBags. Αυτό ενισχύεται περιστρέφοντας το καρουσέλ με το εργαλείο χειρισμού ή με μια ελαφρά ανάδευση στο ποτήρι ζέσεως. Ακριβώς 60 min από την έναρξη του βρασμού απομακρύνεται το ποτήρι ζέσεως από την εστία, σηκώνεται το καρουσέλ έξω από το ποτήρι χρησιμοποιώντας το εργαλείο χειρισμού και με αυτό το τρόπο στραγγίζονται τα FibreBags από το διάλυμα. Το περιεχόμενο του ποτηριού ζέσεως απορρίπτεται στα απόβλητα. Τα δείγματα πλένονται 3 - 5 φορές με ζεστό νερό (περίπου 100 ml) μέχρι να απαλλαχθούν από το απορρυπαντικό. Τα FibreBags με το υπόλειμμα του δείγματος τοποθετούνται σε προζυγισμένα χωνευτήρια (τιμή  $m_6$ ), τα οποία έχουν προηγούμενα αποτεφρωθεί στους 600 °C. Τοποθετούνται σε φούρνο στους 105 °C για τουλάχιστον 4 ώρες ή για όλη τη νύχτα και στη συνέχεια σε ξηραντήρα για 30 min και ζυγίζονται, τιμή  $m_3$ . Το υπόλειμμα του δείγματος μαζί με το FibreBag αποτεφρώνεται στους 600 °C για τουλάχιστον 4 ώρες ή overnight. Οι ατμοί που προκύπτουν δεν είναι επικίνδυνοι. Μετά την αποτέφρωση, το χωνευτήριο αφήνεται να ψυχθεί σε ξηραντήρα για 30min και ζυγίζεται, τιμή  $m_4$

#### Υπολογισμός περιεκτικότητας λιγνίνης, κυτταρίνης και ημικυτταρίνης:

Η περιεκτικότητα σε NDF ή ADF ή ADL είναι το μη διαλυτό μέρος που απομένει μετά το βρασμό στο έκαστο διάλυμα του απορρυπαντικού αφού αφαιρεθεί το περιεχόμενο σε τέφρα. Κατά συνέπεια, υπολογίζεται από τις Εξισώσεις 9, 10.

$$\% = \frac{((m_3 - m_1) - (m_4 - m_5)) \times 100}{m_2} \quad (\text{Εξίσωση 9}), \quad \text{και } m_5 = m_7 - m_6 \quad (\text{Εξίσωση 10})$$

Όπου:

m1 = μάζα του FibreBag (g)

m2 = μάζα αρχικού ξηρού δείγματος (g)

m3 = μάζα της κάψας με FibreBag και υπόλειμμα δείγματος μετά την πέψη (g)

m4 = μάζα κάψας με τέφρα (g)

m5 = μάζα τέφρας κενού FibreBag (g)

m6 = μάζα κάψας (g)

m7 = μάζα κάψας με τέφρα κενού FibreBag (g)

### 3.2.8. Προσδιορισμός πρωτεϊνών

#### Μέθοδος Kjeldhal

Κατά τη μέθοδο Kjeldahl οι οργανικές ενώσεις του δείγματος οξειδώνονται με πυκνό H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> παρουσία καταλύτη (Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>).

Αρχή της μεθόδου: Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης. Η μέθοδος στηρίζεται στη μετατροπή οποιασδήποτε μορφής οργανικού αζώτου σε ανόργανο άζωτο (ανοργανοποίηση οργανικού αζώτου).

#### Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο Kjeldhal ήταν διάλυμα NaOH 40% w/w (Sigma-Aldrich), διάλυμα βορικού οξέος 4% με δείκτες bromocresol green και methyl red και πρότυπο διάλυμα HCl 0,1 N (Sigma-Aldrich).

#### Περιγραφή της μεθόδου

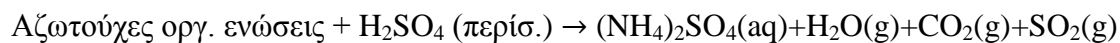
Ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό περίπου 1 g ξηρού και αλεσμένου δείγματος μέσα σε ειδικό χάρτινο υποδοχέα, ο οποίος είναι ελεύθερος αζώτου. Ο υποδοχέας με το δείγμα τοποθετείται με προσοχή στον πάτο της ειδικής φιάλης των 500 ml. Συνολικά, χρησιμοποιούνται έξι φιάλες, όπου στη συνέχεια προστίθενται από δύο ταμπλέτες καταλύτη και με σιφώνιο 25 ml πυκνό H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Οι φιάλες τοποθετούνται σε ειδικό στατό της συσκευής καύσης, η οποία βρίσκεται μέσα στον απαγωγό. Το στατό σφραγίζει με ειδικό καπάκι, το οποίο αποτελεί μια διάταξη απαγωγής των καυσαερίων. Αφού σφραγιστεί το καπάκι, δημιουργείται κενό αέρος μέσω ψυκτήρα



νερού. Γίνεται εκκίνηση της συσκευής καύσης. Η καύση διαρκεί μια ώρα στους 430 °C, στο τέλος της οποίας το διάλυμα πρέπει να είναι πλέον διαυγές. Διακόπτεται η λειτουργία της συσκευής, ενώ το καπάκι της διάταξης απαγωγής ανοίγεται μόνο όταν κρυώσει το διάλυμα και δεν διακρίνονται ατμοί, ενώ ταυτόχρονα παύει η λειτουργία του ψυκτήρα. Σε κάθε φιάλη προστίθενται, με ογκομετρικό κύλινδρο, 50 ml απεσταγμένο νερό. Μετά την προθέρμανση της συσκευής απόσταξης, έχοντας στη θέση του προς απόσταξη διαλύματος απεσταγμένο νερό, η πρώτη απόσταξη γίνεται με φιάλη χωρίς δείγμα στην οποία έχει προστεθεί μόνο νερό. Η υπό ανάλυση φιάλη τοποθετείται στην ειδική θέση στη συσκευή απόσταξης και προστίθενται αυτόματα από τη συσκευή Foss 30 mL H<sub>2</sub>O και 100 mL NaOH. Η απόσταξη αρχίζει και το απόσταγμα συλλέγεται σε κωνική φιάλη που περιέχει 50 mL βορικό οξύ. Το σωληνάκι από το οποίο λαμβάνεται το απόσταγμα πρέπει να είναι βυθισμένο μέσα στο βορικό οξύ για να μην ξεφύγει η αμμωνία (αέριο) στο χώρο. Η αμμωνία σε αυτό το σημείο δεσμεύεται ποσοτικά ως βορικό αμμώνιο. Στο βορικό αμμώνιο που σχηματίζεται γίνεται προσθήκη 2–3 σταγόνων δείκτη και ακολουθεί ογκομέτρηση με διάλυμα HCl 0,1N. Ο δείκτης από μωβ χρώμα που έχει αρχικά, αλλάζει σε πράσινο (σκούρο) στο κρίσιμο σημείο και στο ισοδύναμο σημείο το χρώμα του γίνεται γαλάζιο, οπότε σταματά η ογκομέτρηση.

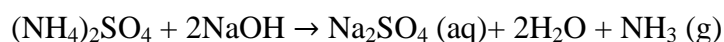
Συνοπτικά τα στάδια της μεθόδου είναι:

α. Καύση:

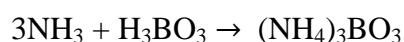


Καταλύτης

β. Απόσταξη:



γ. Δέσμευση αμμωνίας:



δ. Ογκομέτρηση διάλυμα HCl 0,1 N.

$$\% \text{ Αζώτου} = \frac{V \cdot N \cdot 14.007 \cdot 100}{\text{mg δείγματος}} \text{ (Εξίσωση 11)}$$

$$\text{Περιεκτικότητα πρωτεΐνης (\%)} = \% \text{ Αζώτου} \cdot 6,25 \text{ (Εξίσωση 12)}$$

Όπου V: τα καταναλωθέντα ml υδροχλωρικού οξέος κατά την ογκομέτρηση, N: η κανονικότητα του διαλύματος υδροχλωρικού οξέος, O συντελεστής *Kjeldahl* για τα προϊόντα ισούται με 6,25. Από την % περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο (Εξίσωση 11) προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη πολλαπλασιάζοντας με το συντελεστή 6,25 (Εξίσωση 12) (Ping et al., 2011-b).

### 3.2.9. Προσδιορισμός πηκτινών

#### Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό πηκτίνης είναι HCl 37% v/v (Sigma-Aldrich) και ακετόνη 95% (Sigma-Aldrich).

#### Περιγραφή της μεθόδου

Σε ποσότητα ξηρών και αλεσμένων στεμφύλων προστέθηκαν σε διάλυμα H<sub>2</sub>O οξινισμένο με 1% v/v HCl 37% v/v, έτσι ώστε το διάλυμα να έχει pH 2,2 σε αναλογία στερεού:υγρού/ 1:10 w/v. Το διάλυμα αρχικά θερμαίνεται σε 70<sup>0</sup>C για 45 λεπτά και έπειτα διηθείται, το υγρό (υγρό 1) φυλάσσεται και το στερεό που παραμένει (στερεό 1) ξεπλένεται με 250 mL βραστού νερού, ακολουθεί διήθηση και το υγρό (υγρό 2) φυλάσσεται. Τα υγρό 1 και 2 αναμιγνύονται και όταν βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται στο μείγμα διπλάσια ποσότητα ακετόνης 95% με ταυτόχρονη ανάδευση. Έπειτα το διάλυμα αφήνεται για 60 λεπτά σε ηρεμία και προκύπτει εναιώρημα (πηκτίνη), το οποίο διηθείται υπό κενό σε προζυγισμένο φίλτρο για ανάκτηση του στερεού και ξεπλένεται με ίδια ποσότητα ακετόνης 95% όπως χρησιμοποιήθηκε πρωτότερα. Αφήνουμε το φίλτρο με τη πηκτίνη να ξηρανθεί και έπειτα ζυγίζεται (Suleiman et al., 2013).

### 3.2.10. Προσδιορισμός ταννινών

#### Αντιδραστήρια

1. Για την εκχύλιση των ταννινών:

Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH) 70% (Sigma-Aldrich) και διάλυμα HCl 1% (Sigma-Aldrich)

2. Για το προσδιορισμό των συνολικών ταννινών:

- ❖ Model wine (12 % αιθανόλη (Sigma-Aldrich), 5g/L τρυγικό (Sigma-Aldrich), pH 3,3 με NaOH 1N (Sigma-Aldrich)): Για 1 L διαλύματος, σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται περίπου 500 mL H<sub>2</sub>O, 120 mL αιθανόλη και 5 g τρυγικό οξύ και αναδεύεται μέχρι να διαλυθούν. Το pH διορθώνεται στο 3,3 με NaOH 1N, και συμπληρώνεται ο όγκος σε ογκομετρική φιάλη 1 L με H<sub>2</sub>O.
- ❖ Διάλυμα A (200 mM οξικό οξύ (Sigma-Aldrich), 170 mM NaCl (Sigma-Aldrich) και NaOH (Sigma-Aldrich) (pH 4,9)): Για 200 mL διαλύματος, σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται περίπου 150 mL H<sub>2</sub>O και προστίθενται 2,4 g οξικού οξέος και 1,98 g NaCl. Αναδεύονται μέχρι να διαλυθούν και γίνεται διόρθωση του pH στην τιμή 4,9 με 1N NaOH. Ο όγκος συμπληρώνεται σε ογκομετρική φιάλη 200 mL με H<sub>2</sub>O.
- ❖ Πρωτεϊνικό διάλυμα BSA 1g/L: Για 100 mL διαλύματος, σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως τοποθετείται μικρή ποσότητα διάλυμα A και 100 mg BSA-fraction V (Sigma-Aldrich). Ακολουθεί ανάδευση για να διαλυθεί κι ο όγκος συμπληρώνεται σε ογκομετρική φιάλη 100 mL με διάλυμα A.
- ❖ Διάλυμα TEA-SDS [5% v/v τριαιθανολαμίνη (TEA) (Sigma-Aldrich) - 10% w/v διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS) (Sigma-Aldrich)]. Για 100 mL διαλύματος, σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως, τοποθετείται μικρή ποσότητα H<sub>2</sub>O και προστίθενται 5 mL TEA και 10 g SDS με πολύ ήπια ανάδευση. Το διάλυμα παραμένει μία μέρα και ο όγκος συμπληρώνεται την επόμενη με H<sub>2</sub>O τον όγκο σε ογκομετρική φιάλη στα 100mL με H<sub>2</sub>O.
- ❖ Διάλυμα FeCl<sub>3</sub> (10mM FeCl<sub>3</sub> σε 0,01N HCl): Για 100 mL διαλύματος, σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως, τοποθετούνται μικρή ποσότητα H<sub>2</sub>O, 0,083 mL πυκνού HCl 37% και 270 mg ένυδρου FeCl<sub>3</sub>. Αναδεύονται μέχρι να

διαλυθούν και ο όγκος συμπληρώνεται με H<sub>2</sub>O στα 100 mL σε ογκομετρική φιάλη.

### Εκχύλιση Ταννινών

Ξηρό δείγμα αναμείχθηκε με 70% MeOH και 1% HCl 37% σε αναλογία στερεού/ υγρού/ 1:20 w/v, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υπερήχους (Ultrasonic, Elma S 70) για 20 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό και στο στερεό επαναλήφθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία ανανεώνοντας κάθε φορά το διαλύτη για την πληρέστερη εκχύλιση των ταννινών, και στα τρία στάδια προστέθηκε ο ίδιος όγκος διαλύτη.

Ο διαλύτης με τις ταννίνες που εκχυλίστηκαν, από τις τρεις εκχυλίσεις, μεταφέρθηκε σε στεγνή και προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης των 500 mL. Με περιστροφική εξάτμιση υπό κενό στους 40°C ανακτήθηκε ο διαλύτης και οι ταννίνες παρέμειναν στα τοιχώματα της φιάλης. Η φιάλη εξάτμισης στη συνέχεια τυλίχθηκε 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 25 mL μεθανόλη (Hangerman & Butler, 1978; Harbertson et al., 2002).

### Προσδιορισμός ολικών ταννινών

*Αρχή της μεθόδου Harbertson:* βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με άλλα μόρια, όπως η αλβουμίνη (πρωτεΐνη) και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Στη συνέχεια επαναδιαλύονται σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ταννινών μετά από αντίδραση με χλωριούχο σίδηρο. Ο χλωριούχος σίδηρος αντιδρά με τα μόρια των πολυφαινολών και σχηματίζει σύμπλοκα Fe-(OR)<sub>6</sub> (το OR αντιστοιχεί σε ιονισμένα φαινολικά μόρια) τα οποία έχουν ιώδες χρώμα σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζονται ποσοτικά μετρώντας την απορρόφηση στα 510 nm. Η συγκέντρωση των ταννινών στα σύμπλοκα ταννίνης-πρωτεΐνης είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης του δείγματος. Για την ποσοτική παραλαβή του συνόλου των ταννινών του δείγματος

είναι απαραίτητο το πρωτεϊνικό διάλυμα να περιέχει διπλάσια ποσότητα αλβουμίνης σε σχέση με την συγκέντρωση των ταννινών. Η περίσσεια πρωτεΐνης δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα.

### Περιγραφή της μεθόδου

Πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις των δειγμάτων με model wine 10 και 20 φορές. Σε erppendorf τοποθετούνται 500  $\mu\text{L}$  αραιωμένου δείγματος και 1 mL πρωτεϊνικού διαλύματος BSA. Γίνεται ήπια ανάδευση για 15 min και το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 min στις 12000 rpm υπό ψύξη. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται 250  $\mu\text{L}$  μη πρωτεϊνικού διαλύματος (διάλυμα A). Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 min στις 12000 rpm υπό ψύξη. Το υπερκείμενο απομακρύνεται. Στο ίζημα προστίθενται 875  $\mu\text{L}$  διαλύματος TEA-SDS και αφήνεται σε ηρεμία για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αναδεύεται σε vortex για να διαλυθεί το ίζημα. Μετά την ανάδευση παραμένει για 10 min σε ηρεμία και μετρίεται η απορρόφηση στα 510 nm (A 1) με κυψελίδα στένωσης σε φασματοφωτόμετρο με λάμπα αλογόνου. Για τον μηδενισμό του οργάνου (μάρτυρας) χρησιμοποιείται διάλυμα TEA-SDS. Στη συνέχεια προστίθενται 125  $\mu\text{L}$  διαλύματος  $\text{FeCl}_3$  και μετά από 10 min μετρίεται ξανά η απορρόφηση στα 510 nm (A 2).

### Υπολογισμοί

Παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα κατεχίνης. Η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ολικών ταννινών. Ο προσδιορισμός του συνολικού ταννινικού περιεχομένου των δειγμάτων έγινε με τη χρήση της εξίσωσης:  $y = 0,0082 \cdot x + 0,0104$  με συντελεστή προσδιορισμού  $R^2=0,9999$  (με εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων), όπου x η απορρόφηση στα 510 nm και y η συγκέντρωση των ολικών ταννινών σε mg κατεχίνης/L. Τα μίγματα που δημιουργούνται αναδεύονται (vortex) και παραμένουν κλειστά, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 min. Παίρνουμε τις απορροφήσεις στα 510 nm.

Στη συνέχεια υπολογίζεται η διαφορά  $A = (A 2) - (A 1)$  (Εξίσωση 13)

Από την καμπύλη αναφοράς και Εξίσωση 1 βρίσκεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη διαφορά των απορροφήσεων, έστω C1.

Άρα, η τελική συγκέντρωση ταννινών είναι  $C=C1*(\text{αραιώση})$  mg/L οίνου. (Εξίσωση 14)

### 3.3. Υδρολύσεις

Πραγματοποιήθηκε σειρά υδρολύσεων με σκοπό την παραλαβή υδρολύματος μονοσακχαριτών για να χρησιμοποιηθούν μετέπειτα ως θρεπτικό μέσο ζύμωσης.

#### Αντιδραστήρια

Για την αλκαλική υδρόλυση της λιγνίνης, χρησιμοποιήθηκε υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 1,5% w/v, ενώ για την όξινη υδρόλυση της ημικυτταρίνης θειικό οξύ ( $H_2SO_4$ ) 3% w/v. Για την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης, έγινε χρήση των ενζύμων κυτταρινάση από *Aspergillus* sp. και β-γλυκοσιδάση από καρύδια τα οποία προμηθεύτηκαν από τη Sigma-Aldrich, 50mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού νατρίου (pH 5) το οποίο παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας 0,1M κιτρικού οξέος και 0,1M κιτρικού τρινατρίου, καθώς και έγινε χρήση επιφανειοδραστικών, της αλβουμίνης ορού βοός (BSA) και του πολυσορβικού (Tween 80) της Sigma-Aldrich και τέλος για την αδρανοποίηση των ενζύμων προστέθηκε τριχλωροξικό οξύ (TCA) 5% w/v.

#### 3.3.1. Αλκαλική υδρόλυση λιγνίνης

Για τη διαδικασία της απολιγνινοποίησης, 2,5 g ξηρού και αλεσμένου δείγματος αναμιγνύονται με 100 mL NaOH 1,5% (w/v). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 80 °C για 5 ώρες. Έπειτα ακολουθεί διήθηση με απλό ηθμό το υγρό φυλάσσεται για πιθανές περαιτέρω αναλύσεις και το στερεό ξεπλένεται με βραστό νερό περίπου 7-10 φορές. Στη συνέχεια το στερεό ξηραίνεται στους 60 °C για 24 ώρες για να πραγματοποιηθεί η όξινη υδρόλυση της ημικυτταρίνης (Sun et al., 1995).

### 3.3.2. *Οξινή υδρόλυση ημικυτταρίνης*

Ξηρό και απαλαγμένο από λιγνίνη δείγμα αναμειγνύεται με διάλυμα  $H_2SO_4$  3% w/v σε αναλογία στερεού:υγρού / 1:4 (w/v) και τοποθετείται σε αυτόκαυστο στους  $121^{\circ}C$  για 40 min. Έπειτα το διάλυμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό όπου παραλαμβάνεται το διήθημα, το οποίο αποτελεί το υδρόλυμα ημικυτταρίνης. Το στερεό έπειτα ξεπλένεται με βραστό νερό 2-3 φορές και ξηραίνεται στους  $60^{\circ}C$  για 24 ώρες για να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης (Chandel et al., 2012)

### 3.3.3. *Ενζυμική Υδρόλυση κυτταρίνης*

Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας κυτταρινάση και β-γλυκοσιδάση, η ενεργότητα των οποίων μετρήθηκε με τη μέθοδο Zhang et al. (2012). 2 g Ξηρού δείγματος αναμειγνύονται με 20 mL 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού νατρίου (pH 5). Έπειτα ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων κυτταρινάσης (20 FPU/g) και β-γλυκοσιδάσης (80 pNPG/g) και τοποθετούνται σε αναδευτήρα στους  $50^{\circ}C$ , 150 rpm και πραγματοποιείται λήψη δειγμάτων το πρώτο εικοσιτετράωρο κάθε 6 ώρες και έπειτα κάθε 12 ώρες για περίπου 100 ώρες στο σύνολο. Για τη δειγματοληψία με ηλεκτρονική πιπέτα, παραλαμβάνεται 1 mL δείγματος και προστίθεται 1 mL τριχλωροξικού οξέος (TCA) 5% w/v για την αδρανοποίηση των ενζύμων, έπειτα φυγοκεντρείται, λαμβάνεται και φυλάσσεται το υπερκείμενο στους  $-4^{\circ}C$ . Τέλος δοκιμάστηκε η προσθήκη επιφανειοδραστικών (BSA, Tween) κατά την ενζυμική υδρόλυση (Lim & Lee, 2013).

Όπου 1FPU: Η ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 1  $\mu$ mole ισοδύναμο γλυκόζης από φίλτρο whatman No 1. (from whatman No 1 filter paper unit per min) και

1pNPG: Η ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 1  $\mu$ mole νιτροφαινόλης από την π-νιτροφαινόλο-β-D-γλυκοκυρανόζη το λεπτό.

### Υπολογισμός κατάλληλης ποσότητας ενζύμων

Για τον υπολογισμό της κατάλληλης ποσότητας ενζύμων κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς γλυκόζης με χαρτί whatman νούμερο 1 για την κυτταρινάση και παρανιτροφαινόλης (pNP) για την β-γλυκοσιδάση (Zhang et al., 2009).

### Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των πρότυπων καμπυλών αναφοράς της κυτταρινάσης και της β-γλυκοσιδάσης φαίνονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4:** Αντιδραστήρια για πρότυπες καμπύλες κυτταρινάσης και β-γλυκοσιδάσης

πρότυπη καμπύλη αναφοράς κυτταρινάσης	Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος-κιτρικού νατρίου 0,1M (pH 4,8)	Sigma-Aldrich
	Γλυκόζη	Sigma-Aldrich
	Διηθητικά χαρτιά τύπου Whatman No 1	
	Κυτταρινάση (Novozymes 50013)	Novozymes
	Διάλυμα DNS	Sigma-Aldrich
πρότυπη καμπύλη αναφοράς β γλυκοσιδάσης	Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0,1M (pH 4,8)	Sigma-Aldrich
	Παρανιτροφαινόλη	
	Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης 0,4M (pH 10,8)	Sigma-Aldrich

Η πρότυπη καμπύλη που προέκυψε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της κυτταρινάσης είναι η εξής:  $y = 0,2899 \cdot x + 0,0263$  με συντελεστή προσδιορισμού  $R^2=0,9999$  (με εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων), όπου x η απορρόφηση στα 510 nm και y η συγκέντρωση της κυτταρινάσης σε mg/L. Ενώ η πρότυπη καμπύλη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της β-γλυκοσιδάσης είναι η εξής:  $y = 17,261 \cdot x + 0,0306$  με συντελεστή προσδιορισμού  $R^2=0,999$  (με εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων), όπου x η απορρόφηση στα 410 nm και y η συγκέντρωση της β γλυκοσιδάσης σε mg/L.



### 3.3.4. Χημικές αναλύσεις μετά τις υδρολύσεις για την ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση των σακχάρων

Τα δείγματα που πάρθηκαν από τις υδρολύσεις της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης φυγοκεντρήθηκαν και έπειτα πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για τη ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση των μονοσακχαριτών.

#### 3.3.4.1. Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων πραγματοποιήθηκε με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτρο-σαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959).

Αρχή της μεθόδου DNS: στηρίζεται στην αναγωγή του DNS προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ.

#### Περιγραφή της μεθόδου

Σε 0,5 mL υδρολύματος προστέθηκε 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS ακολουθώντας ανάδευση και θέρμανση στους 100 °C για 5 min ακριβώς και ψύξη αμέσως με H<sub>2</sub>O (20 °C). Έπειτα, προστέθηκαν 5 mL απιονισμένο H<sub>2</sub>O, αναδεύτηκαν και οι απορροφήσεις φωτομετρήθηκαν στα 540 nm. Η συγκέντρωση του δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη  $y=1,7334*x-0,0398$ , με συντελεστή προσδιορισμού  $R^2=0,999$  (με εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων), όπου x η απορρόφηση στα 540 nm και y η συγκέντρωση εκφρασμένη σε g·L<sup>-1</sup> γλυκόζης.

#### 3.3.4.2. 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

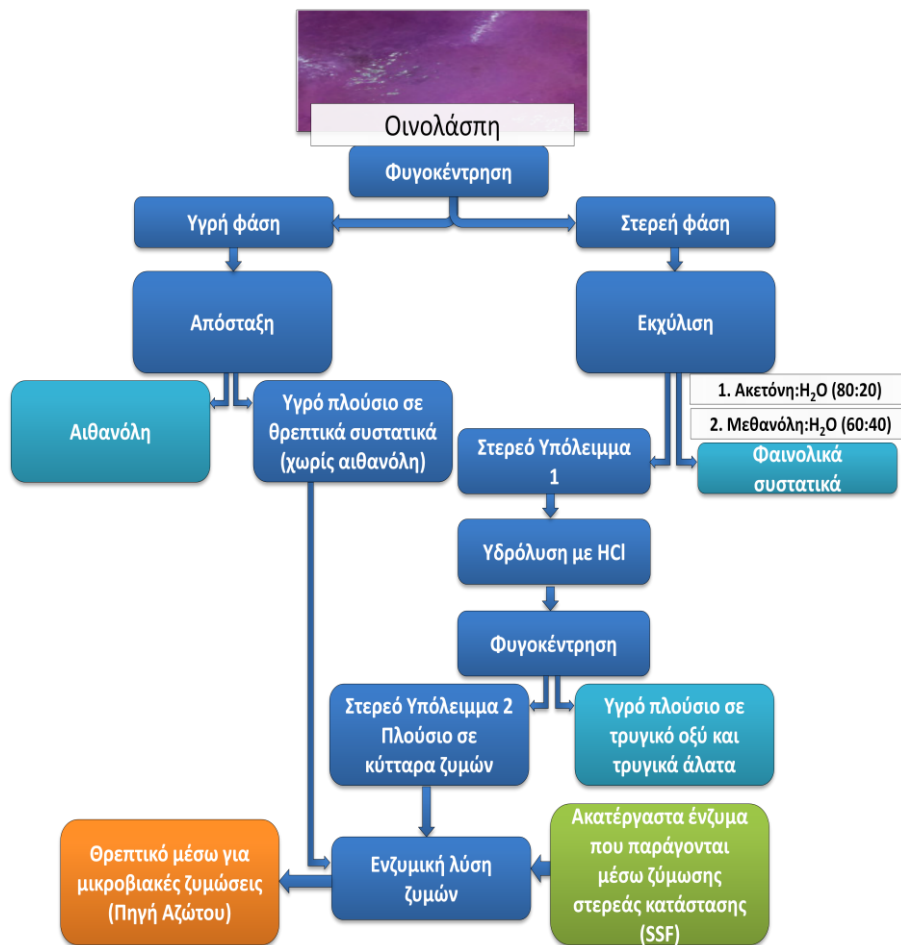
υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των σακχάρων και των παραγόμενων οξέων αφού πρώτα αραιώθηκε με 10mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και φιλτραρίστηκε με τη χρήση φίλτρων whatman που διέθεταν μεμβράνη με πόρους διαμέτρου 0,2 μm.

Τα χαρακτηριστικά του υγρού χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- Στήλη (στατική φάση): Aminex HPX-87H (Bio-rad, Richmond, USA)(300 mm x 7,8 mm)
- Κινητή φάση: 10mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε απιονισμένο, απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό.
- Ανιχνευτής: RI (Shimadzu)
- Αυτόματος δειγματολήπτης
- Ροή κινητής φάσης: 0,6 mL/min
- Όγκος ένεσης: 10μL

#### **3.4. Επεξεργασία και αναλύσεις της οινολάσσης**

Τα υπολείμματα της οινολάσσης που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη προέκυψαν από ερυθρή οινοποίηση στεμφύλων ποικιλίας Αγιωργίτικου Νεμέας, και προτού χρησιμοποιηθεί ως πηγή αζώτου του θρεπτικού μέσου για τη μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Στο *Σχήμα 8* παρουσιάζονται συνοπτικά τα επιμέρους στάδια που πραγματοποιήθηκαν για την επεξεργασία της οινολάσσης.



**Σχήμα 8:** Διάγραμμα ροής της επεξεργασίας της οινολάσπης.

Αρχικά, παραλήφθηκε η οινολάσπη και φυγοκεντρήθηκε στις 9000 rpm (10 °C), προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και να επεξεργαστούν ξεχωριστά. Το υπερκείμενο της φυγοκεντρήσης είναι ένα αλκοολούχο διάλυμα, το οποίο αποστάχθηκε με σκοπό να παραληφθεί ένα θρεπτικό υγρό άνευ αλκοόλης. Επίσης, μέσω αυτής της διαδικασίας ανακτήθηκε η αιθανόλη, ένα προϊόν προστιθέμενης αξίας.

Το ίζημα που προέκυψε από την φυγοκέντρηση αποτελεί την οινολάσπη, η οποία είναι πλούσια σε ζυμομύκητες και μπορεί να αποτελέσει σημαντική πηγή αζώτου για μικροβιακές ζυμώσεις. Η αξιοποίηση της οινολάσπης προς αυτή την κατεύθυνση ήταν εφικτή αφού πρώτα απομακρύνθηκαν τα αντιοξειδωτικά συστατικά και το τρυγικό οξύ. Τούτο, πραγματοποιήθηκε στα εξής δύο στάδια:

#### **3.4.1. Απομάκρυνση φαινολικών συστατικών**

Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκε νωπή οινολάσπη (στερεή φάση 1) και προστέθηκε διάλυμα ακετόνης:H<sub>2</sub>O (αναλογία 80:20) σε ποσότητα που αντιστοιχεί σε 5,3 mL/g ξηρής οινολάσπης. Το μείγμα ανακινήθηκε για 3 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος κι έπειτα φυγοκεντρήθηκε (9000 rpm, 5 °C). Στο νωπό ίζημα, που προέκυψε, προστέθηκε διάλυμα μεθανόλης:H<sub>2</sub>O (αναλογία 60:40) σε ποσότητα ίση με 2,6 mL/g ξηρής οινολάσπης, ακολουθώντας ανακίνηση για 2,5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκέντρηση (9000 rpm, 5 °C) (Chira et al. 2009).

#### **3.4.2. Απομάκρυνση τρυγικού οξέος**

Το νωπό ίζημα (στερεή φάση 2), που προέκυψε από το προηγούμενο στάδιο, επαναδιαλύθηκε σε 3,15 mL απιονισμένο νερό /g ξηρής οινολάσπης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,361 mL π. HCL /g ξηρής οινολάσπης, το μείγμα ανακινήθηκε για 10 min και φυγοκεντρήθηκε (9000 rpm, 5°C) (Salgado et al. 2010). Τέλος, πραγματοποιήθηκε διόρθωση της τιμής του pH στο 5,5 με NaOH 10 M, ξήρανση στους 100±1 °C μέχρι σταθερού βάρους και αποθήκευση σε ξηρό μέρος.

#### **3.4.3. Καλλιέργεια στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε πίτυρο**

Η καλλιέργεια στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε μίγμα 3% ηλίανθου, 2% πιτύρου και 2% άγαρ πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Μετά την αποστείρωση των κωνικών φιαλών στους 121 °C για 20 min, ακολουθούσε ο εμβολιασμός τους με εναιώρημα σπορίων του μύκητα. Προστέθηκε απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό (που περιείχε 1-2 σταγόνες γαλακτωματοποιητή Tween 80), μέσα στις κωνικές φιάλες με τον ανεπτυγμένο μύκητα, ηλικίας περίπου 4 ημερών, ακολουθούμενη από έντονη ανάδευση με αποστειρωμένα μικρά γυάλινα σφαιρίδια, ώστε να απελευθερωθούν τα σπόρια του μύκητα. Το εναιώρημα αυτό, των σπορίων αποτελούσε το εμβόλιο για κάθε κωνική φιάλη με στερεά υπολείμματα, ενώ η ποσότητα του εμβολίου καθοριζόταν κάθε φορά

από το ποσοστό της τελικής προς μελέτη υγρασίας. Μετά τον εμβολιασμό οι φιάλες τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο στους 30°C.

#### Παραλαβή ακατέργαστου ενζύμου

2,5 g από την κωνική φιάλη ζύμωσης στερεάς κατάστασης αναμείχθηκαν με 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος-όξινου φωσφορικού νατρίου σε μπλέντερ κουζίνας για ~5 min. Το μείγμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε για 30 min, στις 9000 rpm και στους 5 °C. Ακολούθησε φιλτράρισμα του υπερκείμενου με φιλτράκια Whatman 0,2 μm και το υγρό που προέκυψε αποτελούσε το ακατέργαστο ένζυμο.

#### **3.4.4. Υδρόλυση οινολάσπης προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας κατάλληλο για μικροβιακές ζυμώσεις**

Με τις βέλτιστες συνθήκες ζύμωσης στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών και οινολάσπη, το στερεό αποικισμένο υπόστρωμα της ζύμωσης προστέθηκε σε εναιώρημα που περιείχε πρόσθετη ποσότητα ξηρής οινολάσπης και το υγρό που παραλήφθηκε από τη φυγοκέντρωση της οινολάσπης και κατόπιν απόσταξης (Σχήμα 8). Σκοπός του πειράματος ήταν να παραχθεί υδατικό μέσο καλλιέργειας, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά (π.χ. πηγές αζώτου), τα οποία είναι απαραίτητα για την μικροβιακή ανάπτυξη και παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Το στερεό αποικισμένο υπόστρωμα της ζύμωσης αναμείχθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε μπλέντερ κουζίνας μαζί με 500 mL αποστειρωμένου υγρού οινολάσπης και μεταφέρθηκε σε φιάλη Duran του 1 L, που περιείχε 500 g/L αποστειρωμένης ξηρής οινολάσπης.

Η διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης έλαβε χώρα στους 45°C, σε pH 5,5 για 50 ώρες περίπου και με αρχική συγκέντρωση ξηρής οινολάσπης 500 mg/L. Η περαιτέρω αξιοποίηση του υδρολύματος, ως θρεπτικό υγρό μικροβιακής ζύμωσης, απαιτεί φιλτράρισμα με τουλπάνι για να απομακρυνθούν τα αιωρούμενα σωματίδια και στη συνέχεια φυγοκέντρωση για 10 min (9000 rpm, 5 °C). Το υπερκείμενο υγρό δύναται να αποθηκευτεί σε συνθήκες κατάψυξης μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

### 3.4.4.1. Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN analysis)

*Αρχή της μεθόδου:* χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen, FAN) μέσω φωτομέτρησης της νινυδρίνης (Lie, 1973).

#### Αντιδραστήρια

Η σύσταση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκε για τη μέθοδο FAN περιγράφεται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5 :** Σύσταση αντιδραστηρίων για την μέτρηση FAN.

<b>Αντιδραστήρια για την μέτρηση FAN</b>	<b>Σύσταση</b>
Colour reagent	49,71 g όξινο φωσφορικό δινάτριο ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 5 g νινυδρίνης, 3 g φρουκτόζης και περίπου 60 g όξινο διφωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) διαλυμένα σε 1 L αποσταγμένου νερού pH 6,6-6,8 Αποθήκευση: 4 °C
Dilution reagent	2 g ιωδικού καλίου ( $\text{KIO}_3$ ) σε 616 mL αποσταγμένου νερού και προσθήκη 384 mL αιθανόλης (καθαρότητας 100%)
Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης	0,1072 g γλυκίνης σε 100 mL απεσταγμένου νερού Αποθήκευση: 4 °C
Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης	1 mL διαλύματος γλυκίνης σε 100 mL αποσταγμένου νερού (2 mL από το παραπάνω διάλυμα περιέχει 2 mg/L FAN)

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (colour reagent). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100°C για 16 min. Ακολούθησε ψύξη των δειγμάτων σε νερό στους 20°C για 20 min. Έπειτα προστέθηκαν 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και αναδεύτηκαν

μέχρι αλλαγής χρώματος (20 sec). Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Spectrometer, Hitachi U-2000) στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου, περιείχε 1 mL απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση του δείγματος σε FAN υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις προτύπου διαλύματος γλυκίνης και είναι η εξής:  $y = 4,5281 * x + 0,015$  με συντελεστή προσδιορισμού  $R^2=0,999$  (με εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων), όπου x η απορρόφηση στα 570 nm και y εκφρασμένη σε mg/L.

### 3.5. Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων

#### Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των βακτηριακών ζυμώσεων και οι εταιρείες από τις οποίες αυτά προμηθεύτηκαν αναγράφονται στον Πίνακα 6.

**Πίνακας 6:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και προμηθευτές.

Αντιδραστήρια	Εταιρείες
TSB, Yeast extract, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 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

#### 3.5.1. Αξιοποίηση αποβλήτων οινοποιείου για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος

Τα απόβλητα οινοποιείου αρχικά υπέστησαν μια σειρά υδρολύσεων. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε το υδρόλυμα ημικυτταρίνης, ενώ ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε το υδρόλυμα οινολάσσης.

### 3.5.2. Βιολογικό Υλικό

Το άγριου τύπου βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στις ζυμώσεις ήταν ο *Actinobacillus succinogenes* 130Z (DSM-22257). Ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από τη μεγάλη κοιλία βοοειδών, δηλαδή από το πρώτο τμήμα του στομάχου των μηρυκαστικών και προμηθεύτηκε από το Ινστιτούτο Leibniz DSMZ.

#### 3.5.2.1. Παρασκευή εμβολίου

Για την παρασκευή του εμβολίου, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Tryptone Soya Broth (TSB) (Πίνακας 7) συγκέντρωσης 30 g/L. 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 αναδεδόμενο επωαστικό κλίβανο υπό αναερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 37 °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 νοπού παρασκευάσματος ή μετά από κατεργασία χρώσης κατά Gram και παρατήρησή της σε οπτικό μικροσκόπιο τύπου Zeiss (Germany).

**Πίνακας 7:** Σύνθεση του θρεπτικού υλικού Tryptone Soya Broth (TSB)

Συστατικά	Σύσταση (g·L <sup>-1</sup> )	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	



### **3.5.2.2. Αποθήκευση**

Οι μικροοργανισμοί διατηρήθηκαν σε κρυογόνα φιαλίδια των 2 mL σε θερμοκρασία  $-30^{\circ}\text{C}$  και σε μέσο που περιείχε υγρό καλλιέργειας και γλυκερόλη σε αναλογία 1:1. Η ανανέωση των μικροοργανισμών λάμβανε χώρα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους.

### **3.5.3. *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. Για την καλύτερη κατανόηση της σχέσης των συστατικών του θρεπτικού υλικού και των παραγομένων προϊόντων και βιομάζας είναι απαραίτητη η στοιχειακή σύνθεση του κυττάρου των μικροοργανισμών (Stanbury et al., 1995).

### **3.5.4. *Ασυνεχής καλλιέργεια με θρεπτικά μέσα απόβλητα οινοποιείου***

Τα υδρόλυματα ημικυτταρίνης συμπυκνώθηκαν σε τέτοιο βαθμό ώστε στο υγρό της ζύμωσης, η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν 30 g/L και 50 g/L και χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα. Επιπλέον το υδρόλυμα της οινολάσπης χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου με αρχική συγκέντρωση ελεύθερων αμινομάδων και πεπτιδίων 440 mg/L FAN καθώς επίσης προστέθηκαν ανόργανα άλατα σε συγκεντρώσεις: 1,16 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,31 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/L  $\text{NaCl}$ , 0,2 g/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  και 0,2 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , όπως και μερικές σταγόνες αντιαφριστικού παράγοντα. Οι ζυμώσεις διεξήχθησαν με έλεγχο του pH μέσω απλής προσθήκης 20 g/L  $\text{MgCO}_3$ .

#### **3.5.4.1. 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 υδρόλυμα της οινολάσπης αποστειρώθηκε ξεχωριστά από τα υπόλοιπα συστατικά του μέσου ζύμωσης, ώστε να αποφευχθεί η αντίδραση των σακχάρων με τις αζωτούχες ενώσεις της οινολάσπης και στην συνέχεια αναμιχθηκε με αυτά υπό ασηπτικές συνθήκες. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε, επίσης, υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.

#### **3.5.4.2. 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.

#### **3.5.5. *Αναλυτικές μέθοδοι***

##### **3.5.5.1. Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN analysis)**

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων και πεπτιδίων (FAN) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο κεφ. 3.4.4.1.

##### **3.5.5.2. 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.

### **3.5.5.3. Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας**

Ο προσδιορισμός της βιομάζας έγινε έμμεσα με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, O.D.) σε φασματοφωτόμετρο (Spectometer, Hitachi U-2000). Κατά τη διάρκεια όλων των ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν, λαμβανόταν δείγμα από το υγρό της καλλιέργειας (2 mL) και η βιομάζα διαχωριζόταν με φυγοκέντρωση 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 φυγοκέντρωση) στα οποία προστέθηκε HCl 7% w/w σε αναλογία 1:20 με σκοπό την εξουδετέρωση του MgCO<sub>3</sub>. 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.

### **3.5.5.4. 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), όπως περιγράφεται στο κεφ. 3.3.4.2.

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### **4.1. Φυσικοχημική σύσταση της λιγνοκυτταρινούχας μάζας**

Το πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός της σύστασης των λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων που επετεύχθη έπειτα από μια σειρά φυσικοχημικών αναλύσεων.

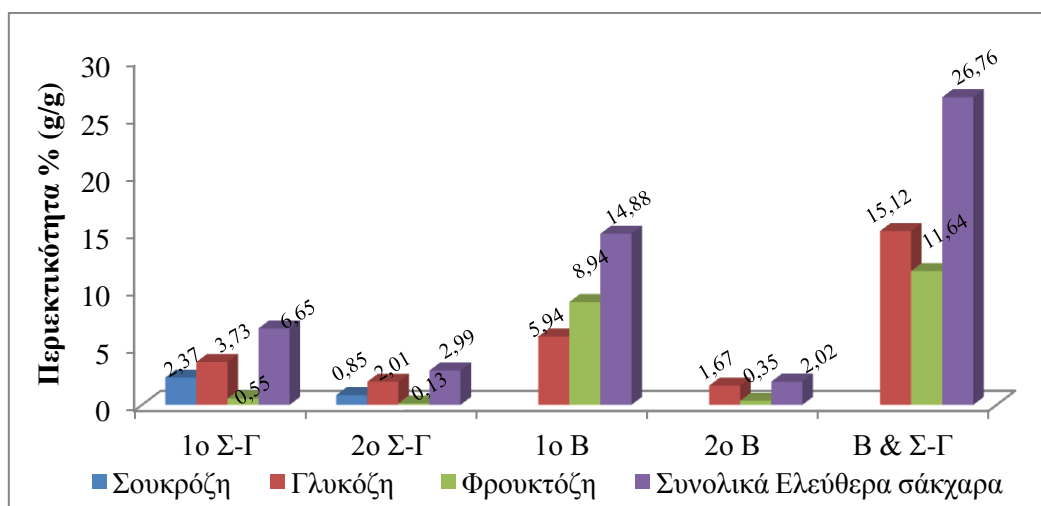
#### **4.1.1. Μέτρηση υγρασίας**

Τα απόβλητα οινοποιείου (υπολείμματα στεμφύλων-γιγάρτων και βόστρυχοι) παραλήφθηκαν και ξηράνθηκαν στους 60°C για 24 ώρες. Τα στερεά διακρίνονται από υψηλή υγρασία (74% (w/w) για τα στέμφυλα-γίγαρτα και 61% (w/w) για τους βοστρύχους), κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο ειδικά για το μίγμα στεμφύλων-γιγάρτων καθώς απομακρύνθηκαν από ενδιάμεσο στάδιο οινοποίησης, όπου εμπεριέχονταν σε υδροαλκοολικό διάλυμα (οίνος). Συγκεκριμένα στα απόβλητα στέμφυλα-γίγαρτα της ποικιλίας Αγιωργίτικου μετρήθηκε αντίστοιχη τιμή (73,6% (w/w)) από τους Lafka et al. (2007). Επίσης σε βοστρύχους, άλλης βέβαια ποικιλίας, αναφέρεται από τους Gonzalez-Centeno et al. (2010) ότι η υγρασία που μετρήθηκε ήταν 61,5% (w/w).

#### **4.1.2. Μέτρηση ελεύθερων σακχάρων και pH**

Έπειτα από δύο συνεχόμενες εκχυλίσεις σε νερό σε αναλογία 1:10 στερεού:υγρού πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση των ελευθέρων σακχάρων από τα στέμφυλα-γίγαρτα, τους βοστρύχους καθώς και του μίγματος αυτών. Η περιεκτικότητα των στεμφύλων-γιγάρτων σε ελεύθερα σάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη) όπως προέκυψε από την ανάλυση του εκχυλίσματος, εκφρασμένη σε g/100g ξηρής μάζας ήταν 9,64% (w/w) ενώ των βοστρύχων 16,9%, αποτέλεσμα το οποίο συνάδει με το ποσοστό 18,22% (w/w) που αναφέρουν οι Spigno et al. (2008), ενώ στο μίγμα τους είναι 26,76% (w/w) αντίστοιχο με το 23,7% (w/w) που αναφέρουν οι Prozil et al. (2012). Στο Σχήμα 9 φαίνεται η περιεκτικότητα των

αποβλήτων σε ελεύθερα σάκχαρα. Η ύπαρξη των ελευθέρων σακχάρων, οφείλεται στο χυμό του σταφυλιού που είχε απομείνει στη βιομάζα κατά την διαδικασία της ερυθρής οινοποίησης, όπως επίσης και στην ύπαρξη ολόκληρων ραγών στο δείγμα λόγω μη ολοκληρωμένης έκθλιψης τους στα πρώτα στάδια της οινοποίησης. Σε αυτό το σημείο πραγματοποιήθηκε επίσης και η μέτρηση του pH, το οποίο και στα δύο εκχυλίσματα ήταν όξινο και πιο συγκεκριμένα στα στέμφυλα-γίγαρτα είχε τιμή ίση με 3,4 ενώ στους στους βοστρύχους ίση με 4,3.



**Σχήμα 9 :** Περιεκτικότητα των στεμφύλων-γίγαρτων (Σ-Γ), βοστρύχων (B) καθώς και μίγματος αυτών (B & Σ-Γ), σε ελεύθερα σάκχαρα έπειτα από δύο στάδια εκχυλίσεων (1ο,2ο) με απιονισμένο νερό.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυσικοχημική ανάλυση των λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων οινοποιείου.

#### 4.1.3. Προσδιορισμός τέφρας

Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Bravo & Saura-Calixto, 1998; Sousa et al., 2014), η περιεχόμενη τέφρα σε απόβλητα οινοποιίας λευκών και ερυθρών ποικιλιών κυμαίνεται μεταξύ 4,65-9,2%. Στην περίπτωση μας όμως, όπου η ποικιλία προς μελέτη ήταν το Αγιωργίτικο (ερυθρή), ενώ η τέφρα των βοστρύχων είναι εντός αυτών των ορίων (8,2% (w/w)), στα στέμφυλα-γίγαρτα η τιμή είναι ελαφρώς χαμηλότερη (4,57 % (w/w)).

#### **4.1.4. Μέτρηση λιπαρής ύλης**

Όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος ο προσδιορισμός του λίπους πραγματοποιήθηκε με τη διάταξη Soxhlet. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά η περιεκτικότητα των στεμφύλων-γιγάρτων σε έλαια, εκφρασμένη σε g/100g ξηρής μάζας, ήταν 13,24% (w/w), το οποίο προέρχεται κυρίως από τα γίγαρτα. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (Llobera & Canellas, 2007; Martinez Massanetet et al., 1986) στην οποία το εύρος της λιποπεριεκτικότητας κυμαίνεται μεταξύ 9-18% (w/w). Πιο συγκεκριμένα, οι Llobera & Canellas (2007), που πραγματοποίησαν ανάλυση λίπους σε μίγμα στεμφύλων-γιγάρτων της ισπανικής ερυθρής ποικιλίας Monte Negro βρήκαν 13,53 % (w/w), χρησιμοποιώντας επίσης τη διάταξη Soxhlet. Στη περίπτωση των βοστρύχων, υπολογίστηκε λίπος 5,8% (w/w) αρκετά μεγαλύτερο ποσοστό από το 1,65% g/g που αναφέρουν οι Llobera & Canellas (2007). Η εκχύλιση λίπους είναι πολύ σημαντική διαδικασία καθώς, το γιγαρτέλαιο λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε λινελαϊκό οξύ (72% (w/w)), είναι ένα προϊόν προστιθέμενης αξίας με ευεργετικές και ενυδατικές ιδιότητες (Da Porto et al., 2013).

#### **4.1.5. Μέτρηση των πρωτεϊνών**

Όπως επίσης προαναφέρθηκε, η μέτρηση των πρωτεϊνών στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή Kjeldhal και φαίνεται ότι το ποσοστό της είναι αρκετά υψηλό. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 10 η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα στέμφυλα ήταν 18,17% (w/w) και 8,1% (w/w) στους βοστρύχους. Από την μελέτη που πραγματοποίησαν οι Llobera & Canellas (2007) σε μίγμα στεμφύλων-γιγάρτων και βοστρύχους, ερυθρής ποικιλίας, προσδιόρισαν την περιεκτικότητά τους σε αζωτούχες ενώσεις χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μικρο-Kjeldhal και βρήκαν παρεμφερείς τιμές (12,2% (w/w) και 7,3% (w/w) αντίστοιχα).

Τα υπολείμματα αποβλήτων οινοποιείου λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε αζωτούχες ενώσεις είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα σε ζυμώσεις στερεής κατάστασης (π.χ. προς παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων), υπόστρωμα για παραγωγή μανιταριών όπως επίσης και σε ζωοτροφές. Επιπλέον, οι

πρωτεΐνες θεωρούνται προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας καθώς συμβάλλουν στην ανάπτυξη, την αναγέννηση και την ανασυγκρότηση του ανθρωπίνου σώματος και βοηθούν στην παραγωγή αντισωμάτων, κυττάρων του αίματος, ορμονών καθώς και ενζύμων (Cetin et al., 2011).

#### 4.1.6. Προσδιορισμός ολικών Φαινολικών και αντιοξειδωτικής ικανότητας

Για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διάφορες μέθοδοι με διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες. Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται αποτελέσματα ολικών φαινολικών από τα απόβλητα οινοποιείου, τα οποία παραλήφθηκαν με διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης.

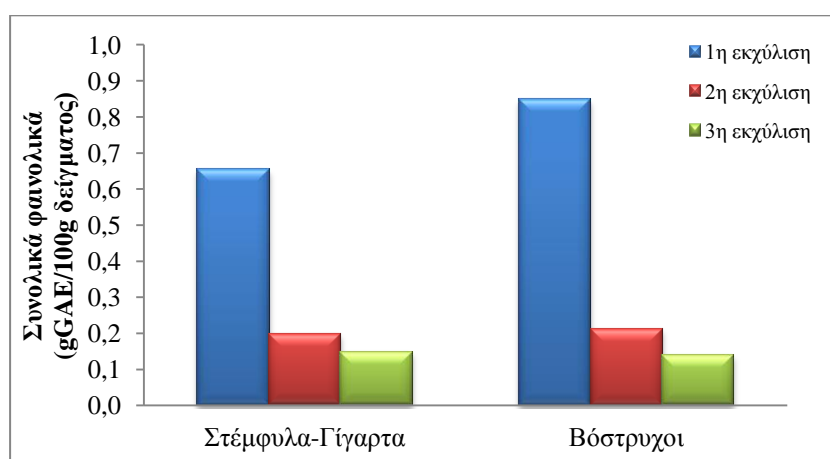
**Πίνακας 8:** Αποτελέσματα μετρήσεων ολικών φαινολικών σε στέμφυλα, γίγαρτα και βοστρύχους όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Πρώτη Ύλη	Ολικά φαινολικά (g GAE/100 g)	Βιβλιογραφία
Κόκκινα στέμφυλα (Cabernet Sauvignon)	2,14	Deng et al., 2011
Κόκκινα στέμφυλα (Manto Negro)	2,63	Llobera & Canellas, 2007
Βόστρυχοι ερυθρής ποικιλίας	2,23	Jayaprakasha et al., 2001
Γίγαρτα ερυθρής ποικιλίας	2,5	Jayaprakasha et al., 2003
Στέμφυλα-γίγαρτα	0,035-1,36	Gonzalez-Paramas et al., 2004
Κόκκινα στέμφυλα-γίγαρτα (Negro amaro)	0,59	Negro et al., 2013
Γίγαρτα ερυθρής ποικιλίας (Negro amaro)	2,4	Negro et al., 2013
Κόκκινα στέμφυλα (Negro amaro)	0,37	Negro et al., 2013

Οι Negro et al. (2003) πραγματοποίησαν εκχυλίσεις φαινολικών σε στέμφυλα και γίγαρτα με όξινο διάλυμα αιθανόλης, όπως ακολουθήθηκε και στη συγκεκριμένη μελέτη. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με τη χρήση υπερήχων (Carrera et al., 2012) για 20 λεπτά σε 3 επαναλήψεις με σκοπό να

αποφευχθεί η εκχύλιση με θέρμανση ή ψύξη, τεχνικές που καταστούν την όλη διαδικασία περισσότερο δαπανηρή.

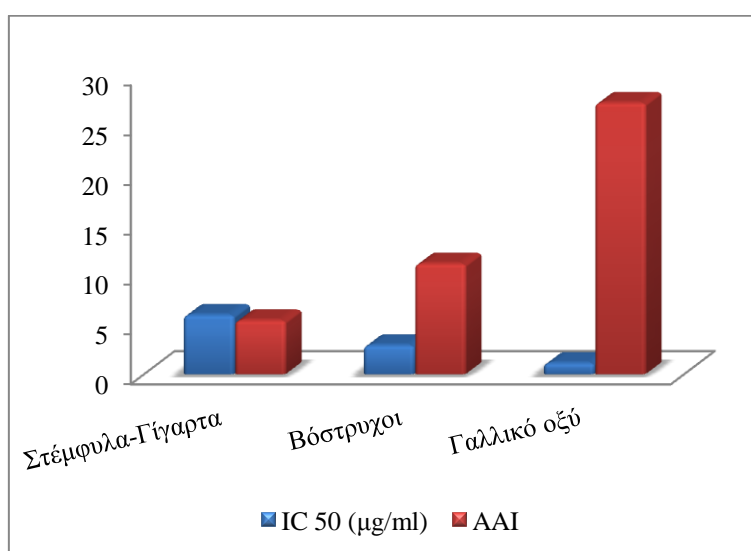
Η μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Για να παραληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερα φαινολικά συστατικά, η διαδικασία της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια καθώς με μια απλή εκχύλιση σε ένα στάδιο δεν μπορεί όλη η ποσότητα των φαινολικών ουσιών να εκχυλιστεί από τον οργανικό διαλύτη. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές για την πλήρη ανάκτηση όλων των φαινολικών συστατικών από αυτό το είδος αποβλήτου απαιτούνται αρκετά στάδια εκχυλίσεων (Lloyd, 2004). Έπειτα από τη διαδικασία της εκχύλισης, το φαινολικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών του δείγματος σε γραμμοϊσοδύναμα γαλλικού οξέος ανά λίτρο δείγματος (g GAE/L). Από την ανάλυση αυτή τελικά προέκυψε ότι στα στέμφυλα τα ολικά φαινολικά ήταν 1 g GAE/100g και στους βοστρύχους 1,2 g GAE/100g (Σχήμα 10). Συγκριτικά, με τη βιβλιογραφία που παρατίθεται στον Πίνακα 8 είναι προφανές ότι το σύνολο των φαινολικών συστατικών είναι ελαφρώς χαμηλότερο σε σχέση με τις υπόλοιπες μελέτες. Πιθανή δικαιολογία αυτού είναι η μη πετυχημένη άλεση των δειγμάτων. Όπως αναφέρουν και οι Spigno et al. (2007) όσο πιο πετυχημένη είναι η άλεση των στερεών αποβλήτων, δηλαδή όσο πιο θρυμματισμένο είναι το δείγμα, η επιφάνεια επαφής με το διαλύτη είναι μεγαλύτερη και επομένως η εκχύλιση αποδοτικότερη.



**Σχήμα 10:** Συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών σε g GAE/100g ξηρών στερεών αποβλήτων οиноποιείου, που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.



Πέρα από την αξιολόγηση της απόδοσης της εκχύλισης των φαινολικών συστατικών με τη μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών που παρελήφθησαν, ένας δεύτερος παράγοντας που μελετήθηκε ήταν η αντιοξειδωτική ικανότητα του φαινολικού εκχυλίσματος μέσω του υπολογισμού της τιμής  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) και του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας (AAI) των δειγμάτων με τη χρήση της μεθόδου της DPPH. Στο Σχήμα 11 παρουσιάζονται οι τιμές  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) καθώς και οι δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας (AAI) για τα εκχυλίσματα των αποβλήτων οινοποιείου καθώς και της καθαρής φαινολικής ένωσης -γαλλικό οξύ- που αναφέρεται στη μελέτη των Scherer & Godoy (2009).



**Σχήμα 11:** Τιμές  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) και οι δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας (AAI) για τα εκχυλίσματα αποβλήτων οινοποιείου, καθώς και καθαρών φαινολικών ενώσεων γαλλικό οξύ (Scherer & Godoy, 2009).

Υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα έχουν οι ουσίες με χαμηλότερη τιμή  $IC_{50}$  και υψηλότερη τιμή AAI. Τα φυτικά εκχυλίσματα έχουν πολύ μικρή αντιοξειδωτική ικανότητα όταν  $AAI < 0,5$ , μέτρια αντιοξειδωτική ικανότητα όταν ο AAI βρίσκεται 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). Χρειάζεται να αναφερθεί ότι η συγκέντρωση της DPPH που χρησιμοποιήθηκε ήταν  $32 \mu\text{g}/\text{mL}$ , ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση των τιμών  $IC_{50}$  μεταξύ των εκχυλισμάτων και άλλων καθαρών φαινολικών ενώσεων (π.χ. γαλλικό οξύ). Από το

*Σχήμα 11* συμπεραίνεται ότι και τα δύο εκχυλίσματα φαινολικών των αποβλήτων οινοποιίας ανήκουν στα πολύ ισχυρά αντιοξειδωτικά καθώς έχουν τιμή AAI μεγαλύτερη του 2, εντούτοις έχουν σαφώς μικρότερη AAI από το γαλλικό οξύ. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα αιθανολικά εκχύλισματά των αποβλήτων οινοποιίας είναι προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας και δύναται να έχουν πληθώρα εφαρμογών όπως σε καλλυντικά (Dwyer et al., 2014), φάρμακα, καθώς επίσης και στην προστασία ελαίων από οξείδωση (Shaker et al., 2006).

Κατόπιν υπολογίστηκε η περιεκτικότητα των ταννινών, η οποία βρέθηκε να είναι στην περίπτωση των υπολειμμάτων των στεμφύλων-γίγαρτων 4,98% (w/w) και στους βοστρύχους 5,13% (w/w) υπολογισμένα επί των ολικών φαινολικών. Τα ποσοστά αυτά αντιστοιχούν σε 61,5 mg/100g ταννινών στα στέμφυλα-γίγαρτα και 49,85 mg/100g ταννινών στους βοστρύχους.

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των σταφυλιών προς οινοποίηση είναι γνωστό ότι η ποικιλία, το στάδιο ωριμότητάς τους, οι καιρικές συνθήκες (ηλιοφάνεια, θερμοκρασία) και η χρήση λιπασμάτων επηρεάζουν τον σχηματισμό των φαινολικών ουσιών. Η τεχνολογία οινοποίησης είναι ένας σημαντικός παράγοντας, καθώς κατά την ερυθρή οινοποίηση ακολουθείται η τεχνική της εκχύλισης (macération). Αυτό σημαίνει ότι μετά την πίεση των σταφυλιών τα στερεά υπολείμματα δεν απομακρύνονται αλλά παραμένουν σε επαφή με το γλεύκος για κάποιο χρονικό διάστημα, με σκοπό ο παραγόμενος οίνος να έχει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τον διακρίνουν. Έτσι, η επαφή του γλεύκους με τα στέμφυλα διευκολύνει την εκχύλιση των φαινολικών στο γλεύκος, με αποτέλεσμα τα υπολείμματα στεμφύλων να μην έχουν υψηλό ποσοστό φαινολικών ουσιών (Κοτσερίδης, 2006), όπως στην περίπτωση των υπολειμμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Άλλη μια παρατήρηση είναι ότι υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών βρίσκεται στα γίγαρτα σε σχέση με τα στέμφυλα όπως φαίνεται και στη μελέτη των Negro et al. (2013) στον Πίνακα 8, καθώς όπως αναφέρουν και οι Castaneda et al. (2009) τα φαινολικά συστατικά, εντοπίζονται στην εφυμενίδα και στον κερατοειδή ιστό του κελύφους των γιγάρτων και αποδεσμεύονται στο περιβάλλον μόνο όταν η επιδερμίδα γίνει διαλυτή (Castaneda et al., 2009).

#### **4.1.7. Προσδιορισμός πηκτινών**

Για το προσδιορισμό της περιεκτικότητας του αποβλήτου σε πηκτίνες πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των δειγμάτων με διάλυμα οξινισμένης ακετόνης. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν βρέθηκε ότι οι βόστρυχοι είχαν περιεκτικότητα 1% (w/w) σε πηκτίνες και τα υπολείμματα στεμφύλων-γιγάρτων 1,64% (w/w). Εδώ είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως τα στέμφυλα που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στη διαδικασία οινοποίησης βρέθηκε ότι περιέχουν 3,92% (w/w) πηκτίνες (Sousa et al., 2014). Οι πηκτίνες λαμβάνουν μέρος στη σύνθεση του λιγνοκυτταρινικού υλικού μαζί με τη λιγνίνη, κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη (Brodeur et al., 2011). Επομένως για να επιτευχθεί αποδοτικότερη υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης, απαιτείται η απομάκρυνση της πηκτίνης. Επιπροσθέτως η πηκτίνη είναι προϊόν προστιθέμενης αξίας λόγω του μεγάλου εύρους εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διογκωτικός και πηκτωματογόνος παράγοντας.

#### **4.1.8. Σύσταση λιγνοκυτταρινούχων συστατικών**

Στη βιβλιογραφία υπάρχει εκτενής αναφορά σχετικά με την ανάλυση και κλασμάτωση της λιγνοκυτταρινούχας μάζας και κυρίως όσον αφορά τους βοστρύχους. Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε η ανάλυση σε δείγμα βοστρύχων καθώς και σε υπόλειμμα στεμφύλων-γιγάρτων της ποικιλίας Αγιωργίτικου με τη μέθοδο NDF, ADF και ADL όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο 3.2.7.

Η περιεκτικότητα των λιγνοκυτταρινούχων συστατικών στους βοστρύχους συνάδει σε μεγάλο βαθμό με αυτή της βιβλιογραφίας, δεδομένου ότι η λιγνίνη βρέθηκε στο 35% (w/w) όταν στη βιβλιογραφία αναφέρεται το εύρος 22,9-47,29% (w/w), η κυτταρίνη 14,6% (w/w) με τη βιβλιογραφία να αναφέρει 12,19-36,3% (w/w) και τέλος η ημικυτταρίνη 26,1% (w/w) όταν στη βιβλιογραφία αναφέρεται 12,5-35,3% (w/w) (Lorenzo et al., 2002; Ping et al., 2011-a; Sluiter et al., 2004; Amendola et al., 2012) (Πίνακας 9).

Στην περίπτωση των στεμφύλων-γιγάρτων η περιεκτικότητα κυμαίνεται σε αντίστοιχα ποσοστά, καθώς η ημικυτταρίνη αποτελεί το 29% (w/w) και η κυτταρίνη, ελαφρώς παραπάνω σε σχέση με τους βοστρύχους, το 20% (w/w). Αντιθέτως η περιεκτικότητα σε λιγνίνη ήταν σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους βοστρύχους, δηλαδή στα 12,38% (w/w), κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς όπως αναφέρεται από τους Mendes et al. (2013) τα στέμφυλα δεν περιέχουν καθόλου λιγνίνη επομένως αυτό το ποσοστό οφείλεται μόνο στα γίγαρτα.

Οι διαφορές των ποσοστών της συγκεκριμένης εργασίας με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία θα μπορούσαν να οφείλονται στη χρήση διαφορετικών αναλυτικών διαδικασιών ή / και παραλλαγές αυτών, καθώς επίσης λόγω της διαφορετικής ποικιλίας σταφυλιού, περιοχών καλλιέργειας και χρονολογιών συγκομιδής.

**Πίνακας 9:** Βιβλιογραφικές αναφορές σύστασης λιγνοκυτταρινούχων συστατικών σε στέμφυλα και βοστρύχους.

	<b>Κυτταρίνη</b>	<b>Ημικυτταρίνη</b>	<b>Λιγνίνη</b>	<b>Βιβλιογραφική αναφορά</b>
Βόστρυχοι	25,30±2,56	13,96±1,26 <sup>α</sup>	47,29±1,24	Sluiter et al. (2004)
Βόστρυχοι	29,9 <sup>β</sup>	35,3	22,9	Lorenzo et al. (2002)
Βόστρυχοι	36,3 <sup>β</sup>	24,5	40,6	Ping et al. (2011-a)
Βόστρυχοι	12,19	25,7	32,35	Amendola et al. (2012)
Στέμφυλα	20,8	12,5	-	Mendes et al. (2013)

α προέκυψε από άθροισμα συγκεντρώσεων ξυλόζης και αραβινόζης

β περιεκτικότητα σε γλυκάνη

Η υψηλή περιεκτικότητα σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη στα στερεά απόβλητα οινοποιείου (41% (w/w) στους βοστρύχους και 49% (w/w) στο μίγμα στεμφύλων-γιγάρτων) ήταν το έναυσμα για τη περαιτέρω επεξεργασία τους, και τελικά την αξιοποίηση τους ως πηγή άνθρακα σε μικροβιακές ζυμώσεις.

Ο προσδιορισμός των φυτικών ινών, και συγκεκριμένα των αδιάλυτων διαιτητικών ινών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη και ινουλίνη) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Weende. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 10, μεγαλύτερο ποσοστό φυτικών ινών βρέθηκε στο μίγμα στεμφύλων-γιγάρτων (27,16% (w/w)) σε σχέση με αυτών στους βοστρύχους (20,46% (w/w)), το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο NDF, ADF και ADL. Επιπροσθέτως,

τα ποσοστά των λιγνοκυτταρινούχων που υπολογίστηκαν με την μέθοδο Weende είναι σαφώς χαμηλότερα, καθώς όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο 3.2.6. η συγκεκριμένη μέθοδος έχει μεγάλο σφάλμα μέτρησης.

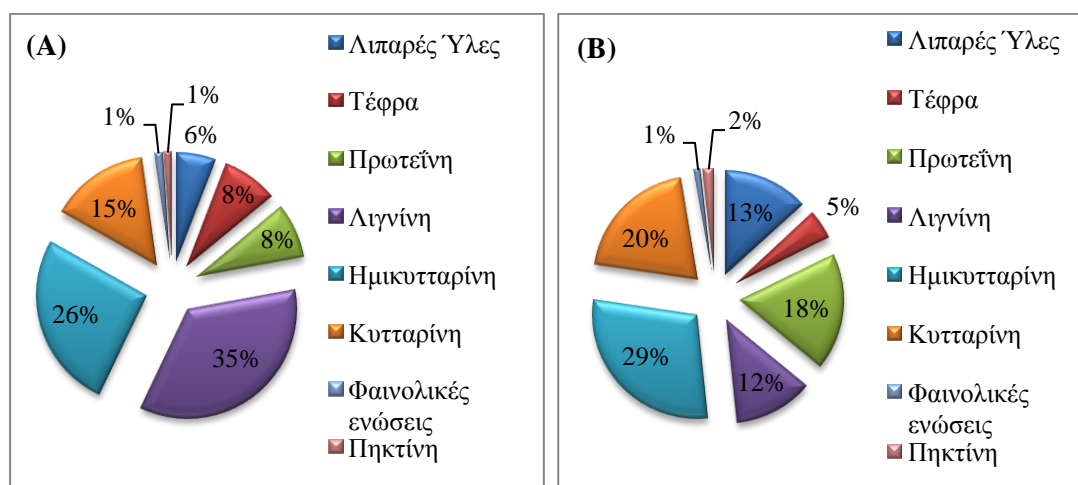
Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται η σύσταση των αποβλήτων βοστρύχων και στεμφύλων-γιγάρτων όπως προέκυψε από την φυσικοχημική ανάλυση.

**Πίνακας 10:** Περιεκτικότητα επί ξηρού τόσο των βοστρύχων όσο και των στεμφύλων-γιγάρτων της ερυθρής ποικιλίας Αγιοργίτικο.

Περιεκτικότητα % (w/w)	Βόστρυχοι	Στέμφυλα-Γιγάρτα
Λιπαρές Ύλες	5,80	13,24
Τέφρα	8,20	4,57
Πρωτεΐνη	8,10	18,17
Λιγνίνη	35,00	12,38
Ημικυτταρίνη	26,10	29,00
Κυτταρίνη	14,60	16,17
Πηκτίνη	1,00	1,64
Φαινολικές ενώσεις*	1,20	1,00
Φυτικές Ίνες	20,46	27,16

\*% g GAE/g

Συγκεντρωτικά στο Σχήμα 12 απεικονίζεται η ποσοστιαία σύσταση των βοστρύχων και των στεμφύλων-γιγάρτων.



**Σχήμα 12:** Περιεκτικότητα επί ξηρού των (Α) βοστρύχων και (Β) στεμφύλων-γιγάρτων της ερυθρής ποικιλίας Αγιοργίτικο.

## 4.2. Υδρολύσεις

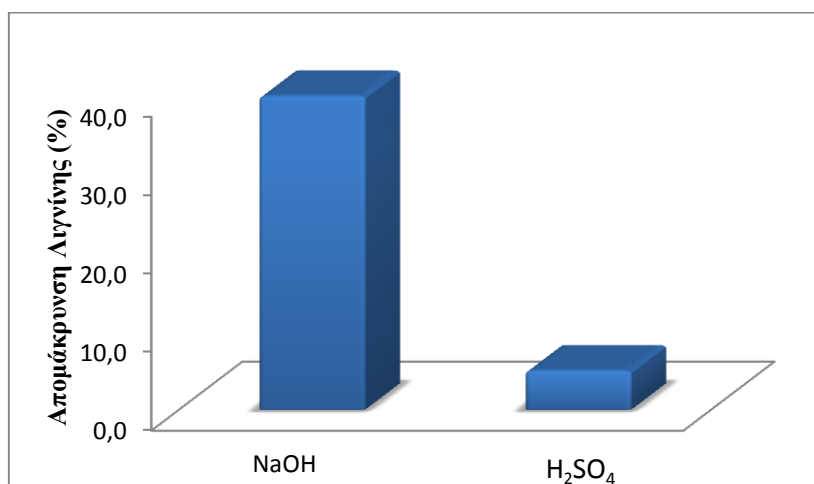
Τα απόβλητα οινοποιείου όπως αναφέρθηκε αποτελούνται κυρίως από λιγνοκυτταρινούχο μάζα, επομένως για την αξιοποίηση τους απαιτείται η υδρόλυση τους. Σκοπός των υδρολύσεων είναι η αποικοδόμηση των μεγαλομορίων όπως είναι η κυτταρίνη και οι ημικυτταρίνες για τη δημιουργία ενός υποστρώματος πλούσιο σε μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, μαννόζη και αραβινόζη). Οι μέθοδοι των υδρολύσεων επιλέχθηκαν με γνώμονα την ελαχιστοποίηση της κατανάλωσης ενέργειας και του σχηματισμού παραπροϊόντων που πιθανόν να προκαλέσουν παρεμπόδιση στα επόμενα στάδια (ζύμωση). Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ήπιας υδρόλυσης. Με τις υδρολύσεις γίνεται εφικτό τα λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα να χρησιμοποιηθούν ως μέσο ζύμωσης, καθώς οι μονοσακχαρίτες είναι δυνατόν να καταναλωθούν από μικροοργανισμούς και συγκεκριμένα στην περίπτωσή μας από το στέλεχος *Actinobacillus succinogenes*. Τέλος είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις υδρολύσεις δεν είχαν απόλυτη ομοιογένεια καθώς σκοπός ήταν η όσο καλύτερη προσομοίωση στις συνθήκες πραγματικού οινοποιείου, όπου είναι αδύνατος ο λεπτομερής διαχωρισμός των συστατικών.

### 4.2.1. Υδρόλυση λιγνίνης

Η επεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχου μάζας ξεκίνησε με την υδρόλυση της λιγνίνης με σκοπό την απομάκρυνση της. Η λιγνίνη δημιουργεί σύμπλεγμα με την ημικυτταρίνη και εσωκλείουν τα ινίδια της κυτταρίνης. Με την διαδικασία της απολιγνινοποίησης, οι υδρολύσεις των υδατανθράκων (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη) που ακολουθούν δύναται να πραγματοποιηθούν με μεγαλύτερη επιτυχία.

Για την απομάκρυνση της λιγνίνης δοκίμαστηκαν δυο διαφορετικές διεργασίες. Οι μέθοδοι αυτές δοκιμάστηκαν αρχικά μόνο σε βοστρύχους, με σκοπό να επιλεγεί η μέθοδος που μπορεί να απομακρύνει το μεγαλύτερο ποσοστό της λιγνίνης και ταυτόχρονα να μην υδrolύει την ημικυτταρίνη. Οι μέθοδοι ήταν: α. Επεξεργασία με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 1,5% w/v σε αναλογία 1:40 στερεό:υγρό και β. Επεξεργασία με θειικό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,8% σε αναλογία 1:4

στερεό:υγρό. Και οι δυο μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν στους 80 °C για 4 ώρες. Επίσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση ADL (κεφάλαιο 3.2.7) σε δείγματα βοστρύχων πριν και μετά την απολιγνινοποίηση με τις δυο μεθόδους. Στην πρώτη περίπτωση η λιγνίνη που απομακρύνθηκε από το δείγμα ήταν το 40 % της αρχικής ενώ στη δεύτερη περίπτωση το 5 % όπως φαίνεται και στο παρακάτω Σχήμα 13.



**Σχήμα 13:** Μέθοδοι απολιγνινοποίησης βοστρύχων με χρήση καυστικού νατρίου (NaOH) και θεικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω αποτελέσματα, για την απολιγνινοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων οινοποιείου επιλέχθηκε η μέθοδος της αλκαλικής υδρόλυσης και τα στερεά επεξεργάστηκαν με διάλυμα NaOH 1,5% w/v. Κατά την αλκαλική υδρόλυση προκαλείται διόγκωση του λιγνοκυτταρινούχου υλικού οδηγώντας σε μια αύξηση στην περιοχή της εσωτερικής επιφάνειας, μείωση του βαθμού πολυμερισμού και της κρυσταλλικότητας όπου τελικά διαχωρίζεται η λιγνίνη από τους υδατάνθρακες και διασπάται η δομή της (Fan et al ., 1987). Επομένως δημιουργείται αύξηση του πορώδους των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Sun & Cheng, 2002).

Οι Sun & Cheng (2002) μελέτησαν διάφορες μεθόδους επεξεργασίας λιγνοκυτταρινούχας μάζας όπως είναι η πυρόλυση, η αυτοϋδρόλυση και η οζονόλυση. Για την απομάκρυνση της λιγνίνης σε πληθώρα λιγνοκυτταρινούχων στερεών (χαρτί, βαμβάκι, μαλακό και σκληρό ξύλο) προτείνουν τη χρήση αραιού διαλύματος NaOH. Καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι στα στερεά με περιεκτικότητα λιγνίνης χαμηλότερης του 15% (χαρτί και άχυρο σίτου) πετυχαίνεται σε μεγάλο

βαθμό η απολιγνινοποίηση, σε αντίθεση με τα στερεά που περιέχουν από 25-35% λιγνίνη, που η απολιγνινοποίηση δεν είναι επιτυχής. Στην περίπτωση των αποβλήτων οινοποιίας τα στέμφυλα-γίγαρτα βρίσκονται στην πρώτη κατηγορία ενώ οι βόστρυχοι στη δεύτερη. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις έπειτα από την αλκαλική υδρόλυση βρέθηκε στα δείγματα λιγνίνη, συγκεκριμένα μετά την ολοκλήρωση της απολιγνινοποίησης, η ανάλυση ADL για τα στέμφυλα-γίγαρτα έδειξε ότι περιείχαν 7,5% (g/g) λιγνίνη ενώ η αντίστοιχη τιμή για τους βοστρύχους ήταν 21% (g/g). Σε πληθώρα ερευνητικών μελετών αναφέρονται ισχυρότερες συνθήκες για την απομάκρυνση της λιγνίνης. Συγκεκριμένα οι Amendola et al. (2012) χρησιμοποίησαν στη μελέτη τους της τη μέθοδο της αυτό-υδρόλυσης σε θερμοκρασία 180°C για την επεξεργασία βοστρύχων.

#### **4.2.2. Υδρόλυση ημικυτταρίνης**

Στην παρούσα μελέτη δοκιμάστηκε μια σειρά μεθόδων ήπιας υδρόλυσης, όπως προτείνονται από την βιβλιογραφία (Mosier et al., 2005; Spigno et al., 2008; Chandel et al., 2012). Οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- 1N υδροχλωρικό οξύ (HCl) και θέρμανση στους 100 °C για μια ώρα
- 0,3N υδροχλωρικό οξύ (HCl) θέρμανση σε αυτόκαυστο (121 °C) για 20 λεπτά
- Απιονισμένο νερό και θέρμανση σε αυτόκαυστο (121 °C) για 20 λεπτά
- Θεϊκό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) σε διαφορετικές περιεκτικότητες σε αναλογία 1:4 στερεού:υγρού σε θερμοκρασία 121 °C σε διαφορετικούς χρόνους υδρόλυσης (30, 45 και 55 λεπτά).

Από τις παραπάνω μεθόδους, μόνο η υδρόλυση με θεϊκό οξύ ήταν αρκετά δραστική ώστε να διασπαστεί η ημικυτταρίνη. Οι άλλες διεργασίες έδωσαν κανένα ή πολύ μικρό βαθμό υδρόλυσης.

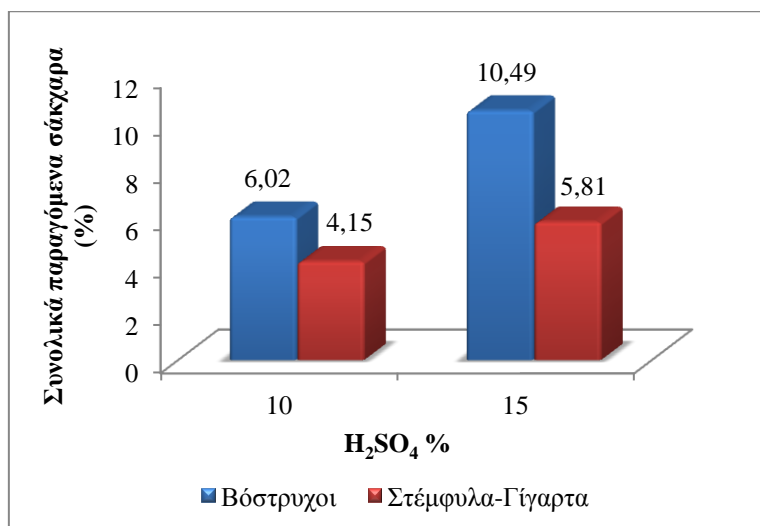
Από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης των λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων οινοποιείου προέκυψε υδρόλυμα μονοσακχαριτών και πιο συγκεκριμένα ξυλόζης, γλυκόζης, γαλακτόζης, αραβινόζης και μαννόζης. Η συγκέντρωση μονοσακχαριτών



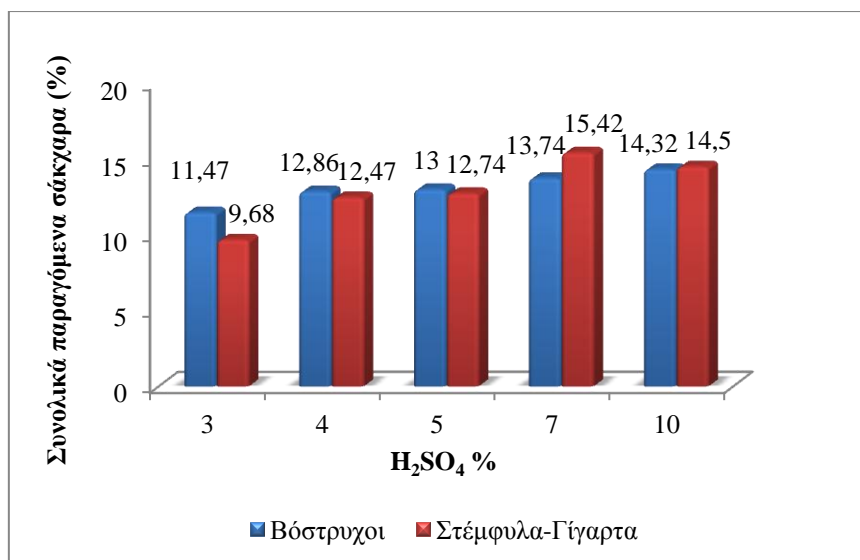
που τελικά προέκυψε από την υδρόλυση των βοστρύχων, των στεμφύλων-γιγάρτων καθώς και του μίγματος τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις θειικού οξέος, αναλύθηκε με χρήση χρωματογραφίας HPLC και απεικονίζεται στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 14-16).

Αρχικά μελετήθηκαν πιο ισχυρές συνθήκες υδρόλυσης, χρησιμοποιώντας πιο πυκνό θειικό οξύ (10 και 15% (v/v)) και για μεγαλύτερο χρόνο (55 λεπτά). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 14, τα υδρολύματα που προήλθαν από τους βοστρύχους περιείχαν 6 % (w/w) και 10,5% (w/w) συνολικά σάκχαρα αντίστοιχα ενώ εκείνα που προήλθαν από την υδρόλυση των στεμφύλων-γιγάρτων μόλις 4,2 (w/w) και 5,8% % (w/w) συνολικά σάκχαρα αντίστοιχα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν υδρολύσεις με διάρκεια 45 λεπτών. Το ποσοστό των συνολικών σακχάρων που προέκυψε με τη χρήση 3% (v/v) διαλύματος θειικού οξέος σε δείγμα βοστρύχων ήταν 11,5% (w/w). Αυξάνοντας την συγκέντρωση του θειικού οξέος παρατηρήθηκε μικρή μεταβολή και της περιεκτικότητας των σακχάρων, καθώς με τη χρήση 10% (v/v) θειικού οξέος προέκυψε υδρόλυμα με 14% (w/w) συνολικά σάκχαρα. Αντίστοιχα ποσοστά προέκυψαν από την υδρόλυση στεμφύλων-γιγάρτων όπου με τη χρήση 3% (v/v) θειικού οξέος σε αυτόκαυστο το υδρόλυμα είχε 9,7% (w/w) συνολικά σάκχαρα ενώ με τη χρήση 10% (v/v) θειικού οξέος 14,5% (w/w) (Σχήμα 15).



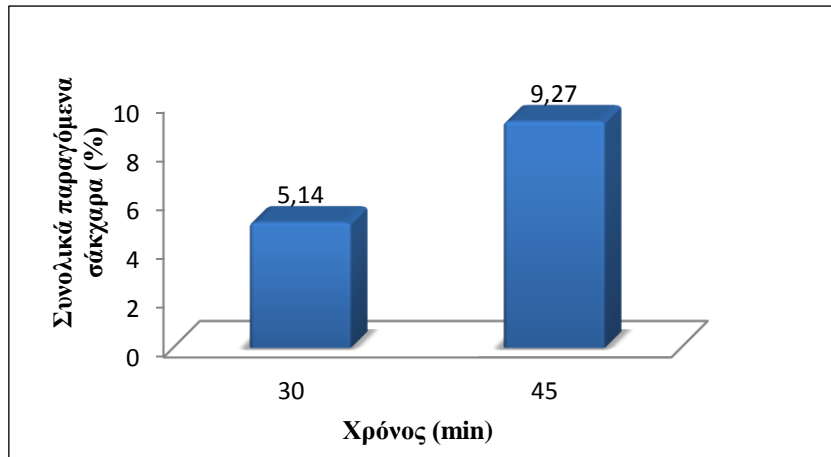
**Σχήμα 14:** Συνολικά παραγόμενα σάκχαρα, επί ξηρού στερεού στα δείγματα βοστρύχων και στεμφύλων-γιγάρτων, μετά από υδρόλυση 55 λεπτών με τη χρήση 10 και 15 % (v/v) θειικού οξέος.



**Σχήμα 15:** Συνολικά παραγόμενα σάκχαρα, επί ξηρού στερεού στα δείγματα βοστρύχων και στεμφύλων-γιγάρτων, μετά από υδρόλυση 45 λεπτών με τη χρήση 3, 4, 5, 7 και 10 % (v/v) θεικού οξέος.

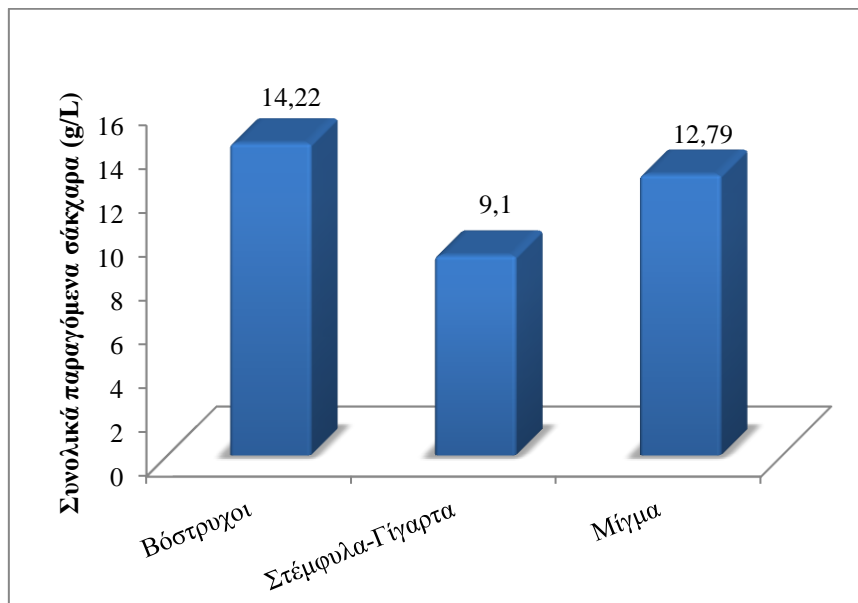
Όπως προκύπτει λοιπόν από τα παραπάνω αποτελέσματα, στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε 10% (v/v) θειικό οξύ για 55 λεπτά, τα συνολικά σάκχαρα ήταν λιγότερα σε σχέση με τα 45 λεπτά χρόνου υδρόλυσης κατά 58% στην περίπτωση των βοστρύχων και 71% λιγότερα στην περίπτωση των στεμφύλων-γιγάρτων.

Τέλος πραγματοποιήθηκε υδρόλυση του μίγματος των λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων με χρήση 3% (v/v) θεικού οξέος για 30 και 45 λεπτά. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν έδειξαν ότι με χρόνο υδρόλυσης 30 λεπτών τα συνολικά σάκχαρα ήταν 5,14% (w/w), ενώ μετά από 45 λεπτά τα συνολικά σάκχαρα ήταν 9,27% (w/w), δηλαδή κατά 44,6% υψηλότερα. Επομένως, αυξάνοντας το χρόνο υδρόλυσης κατά 15 λεπτά επιτεύχθηκε αύξηση της απόδοσης σε σάκχαρα κατά 44,6%.



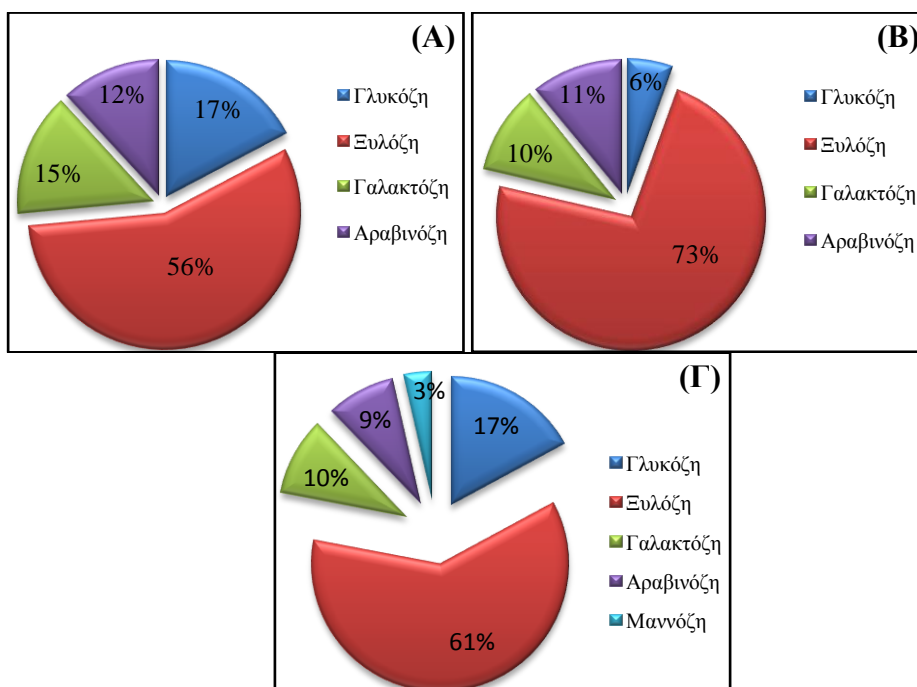
**Σχήμα 16:** Συνολικά παραγόμενα σάκχαρα, επί ξηρού μίγματος λιγνοκυτταρινούχων (βόστρυχοι, στέμφυλα-γίγαρτα), με χρήση 3 % (v/v) θεικού οξέος με διάρκεια υδρόλυσης 30 και 45 λεπτών.

Για να αποφευχθεί η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων θεικού οξέος αποφασίστηκε να ακολουθηθούν οι πιο ήπιες συνθήκες υδρόλυσης και κατ' επέκταση η πειραματική πορεία συνεχίστηκε με τη χρήση 3% θεικού οξέος. Από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης προέκυψε υδρόλυμα βόστρυχων με 14,2 g/L συγκέντρωση σακχάρων, υδρόλυμα στέμφυλων-γιγάρτων με 9,1 g/L συγκέντρωση σακχάρων και υδρόλυμα του μίγματος των λιγνοκυτταρινούχων με 12,8 g/L συγκέντρωση σακχάρων (Σχήμα 17).



**Σχήμα 17:** Συγκέντρωση συνολικών σακχάρων υδrolύματος ημικυτταρίνης από βόστρυχους, στέμφυλα-γίγαρτα και μίγματος αυτών.

Αναλυτικότερα η σύσταση των υδρολυμάτων των βοστρύχων, των στεμφύλων-γιγάρτων καθώς και το μίγμα αυτών απεικονίζονται στο Σχήμα 18. Όπως φαίνεται, κυρίαρχος μονοσακχαρίτης είναι η ξυλόζη σε ποσοστό 56% στους βοστρύχους, 73% στα στέμφυλα-γίγαρτα, ενώ στο μίγμα τους η περιεκτικότητα φθάνει το 61%.



**Σχήμα 18:** Περιεκτικότητα μονοσακχαριτών της ημικυτταρίνης απόβλητων (Α) βοστρύχων, (Β) στεμφύλων-γιγάρτων και (Γ) μίγμα αυτών.

#### 4.2.3. Ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης

Η κυτταρίνη έχει κρυσταλλική δομή λόγω της παράλληλης διάταξης των επιμήκων ευθυγράμμων αλυσίδων γλυκάνης. Για να μετατραπεί η κρυσταλλική κυτταρίνη σε άμορφη, δηλαδή άτακτης διάταξης αλυσίδων, απαιτούνται ισχυρές συνθήκες υδρόλυσης όπως πολύ υψηλή θερμοκρασία (>300 °C) και πίεση (25 MPa). Η επιλογή της χημικής υδρόλυσης δεν χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, πρώτον για να αποφευχθεί η μεγάλη κατανάλωση ενέργειας και δεύτερον για να μειωθούν οι πιθανότητες σχηματισμού παραπροϊόντων όπως είναι η υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF). Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να

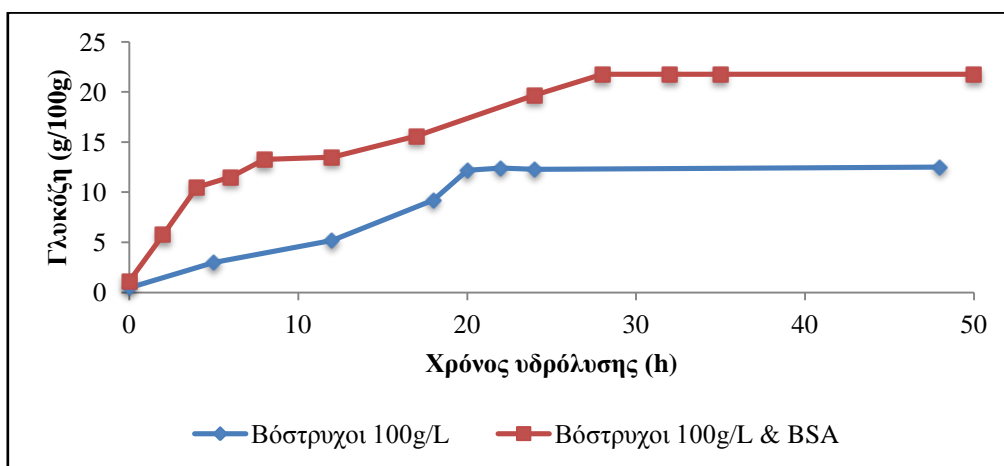
ακολουθηθεί ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης χρησιμοποιώντας τα ένζυμα κυτταρινάσες με σκοπό την απόκτηση υδρολύματος γλυκόζης.

Η προεπεξεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων έχει σημαντική επίδραση στην αποτελεσματικότερη δράση της κυτταρινάσης. Ως εκ τούτου η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μετά από την υδρόλυση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης (Krinstensen et al., 2007). Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές (Sun & Cheng, 2002), η προσθήκη της β-γλυκοσιδάσης στο προς υδρόλυση υπόστρωμα ενισχύει την δράση της κυτταρινάσης και κατ' επέκταση επιτυγχάνεται καλύτερη ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης, δεδομένου ότι η β-γλυκοσιδάση υδρολύει την κελλοβιόζη η οποία δρα ως παρεμποδιστής της δράσης της κυτταρινάσης.

Η υψηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη που απομένει μετά την απολιγνινοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου μάζας προκαλεί εμπόδια στη δράση της κυτταρινάσης και της β-γλυκοσιδάσης κατά την ενζυμική υδρόλυση. Με σκοπό λοιπόν να αυξήσουμε την απόδοση υδρόλυσης της κυτταρίνης μελετήθηκε η προσθήκη επιφανειοδραστικών ουσιών όπως είναι το Tween 80 και το BSA. Η προσθήκη των επιφανειοδραστικών ουσιών στην ενζυμική υδρόλυση διαφόρων λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων έχει βρεθεί ότι ενισχύει την μετατροπή της κυτταρίνης σε μονοσακχαρίτες. Πιο συγκεκριμένα, προτείνεται ότι η επίδραση των επιφανειοδραστικών βασίζεται στην υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ λιγνίνης και επιφανειοδραστικής ουσίας, η οποία προκαλεί στερεοχημική απόθεση του ενζύμου από την επιφάνεια της λιγνίνης (Yang & Wyman, 2006). Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός των επιφανειοδραστικών είναι ότι μειώνουν την πιθανότητα μετουσίωσης των ενζύμων κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης (Yang & Wyman, 2006). Έτσι μελετήθηκαν τρεις τρόποι υδρόλυσης: α. χωρίς την προσθήκη επιφανειοδραστικών, β. με προσθήκη μη-ιονικού επιφανειοδραστικού (Tween 80) και γ. με προσθήκη πρωτεΐνης (BSA).

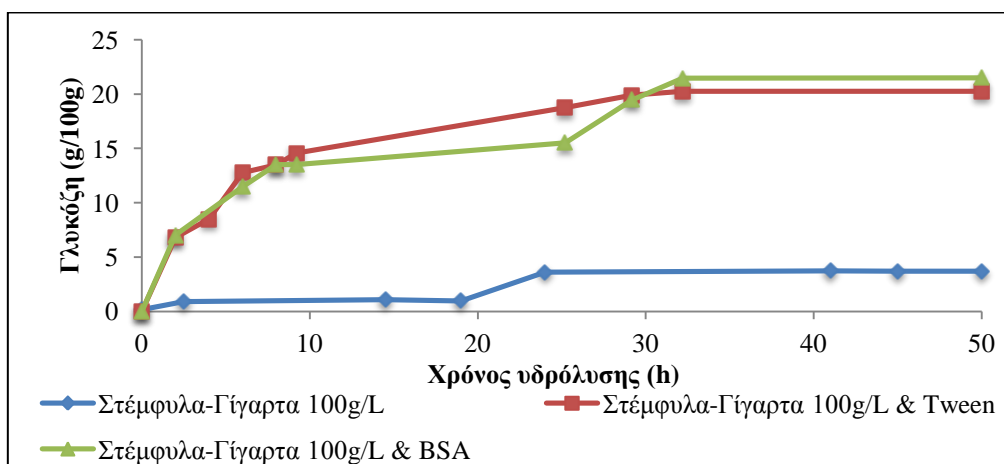
Το αποτέλεσμα της ενζυμικής υδρόλυσης στα παρακάτω γραφήματα εκφράζεται σε ποσοστιαία μετατροπή της ενζυμικής υδρόλυσης ως προς τα συνολικά στερεά μετά την αλκαλική και την όξινη υδρόλυση. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση των βοστρύχων, όπως φαίνεται και στο *Σχήμα 19* μετά την προσθήκη πρωτεΐνης BSA σε στερεό 100 g/L σε 25 ώρες επιτεύχθηκε μετατροπή κυτταρίνης σε

γλυκόζη κατά 30,2% σε αντίθεση με 17,3% μετατροπή που επιτυγχάνεται χωρίς την προσθήκη επιφανειοδραστικού. Τα υψηλά ποσοστά λιγνίνης προφανώς εμποδίζουν την καταλυτική δράση του ενζύμου και με προσθήκη πολύ μικρής ποσότητας BSA της τάξης 120 mg/100 mL η μετατροπή προς γλυκόζη δείχνει να αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό.



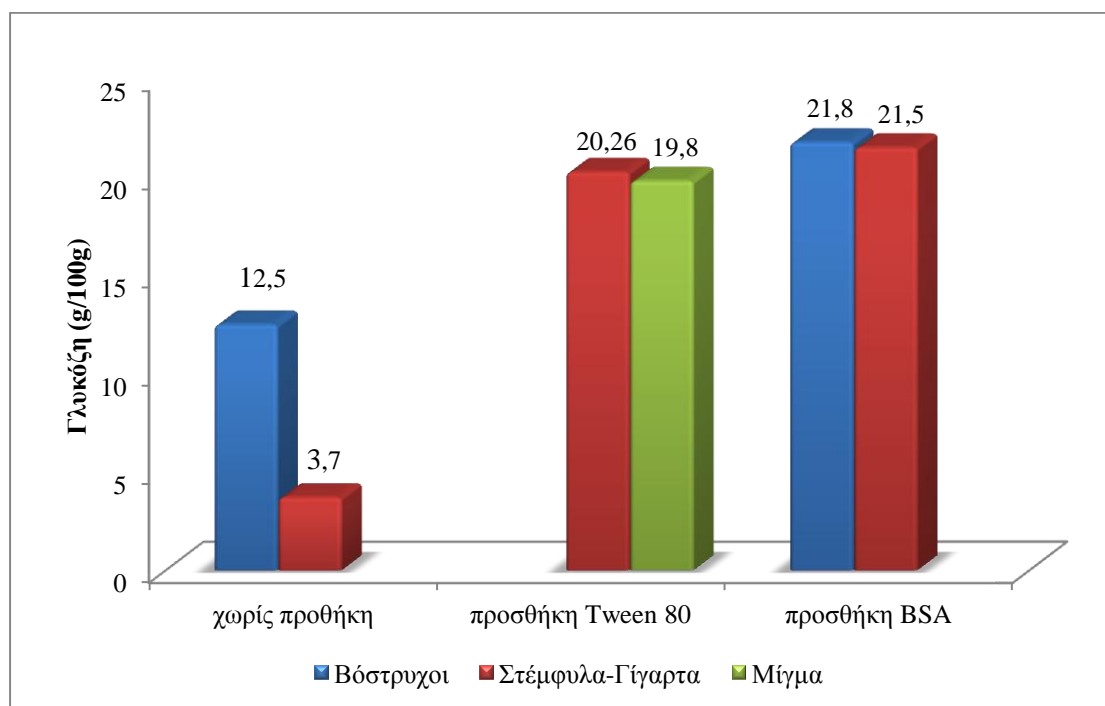
**Σχήμα 19:** Πορεία ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης για παραγωγή γλυκόζης από βόστρυχους.

Η επίδραση της επιφανειοδραστικών ουσιών στην απόδοση της υδρόλυσης μελετήθηκε και στην περίπτωση των στεμφύλων-γίγαρτων (Σχήμα 20). Στην περίπτωση αυτή η αύξηση στη μετατροπή της κυτταρίνης προς παραγωγή γλυκόζης ήταν υψηλότερη απ' ότι στους βόστρυχους και με τα δυο επιφανειοδραστικά. Ωστόσο ελαφρώς υψηλότερη αύξηση της απόδοσης της υδρόλυσης σημειώθηκε στην περίπτωση της προσθήκης πρωτεΐνης BSA.



**Σχήμα 20:** Πορεία ενζυμικής υδρόλυσης προς παραγωγή γλυκόζης στα στέμφυλα-γίγαρτα.

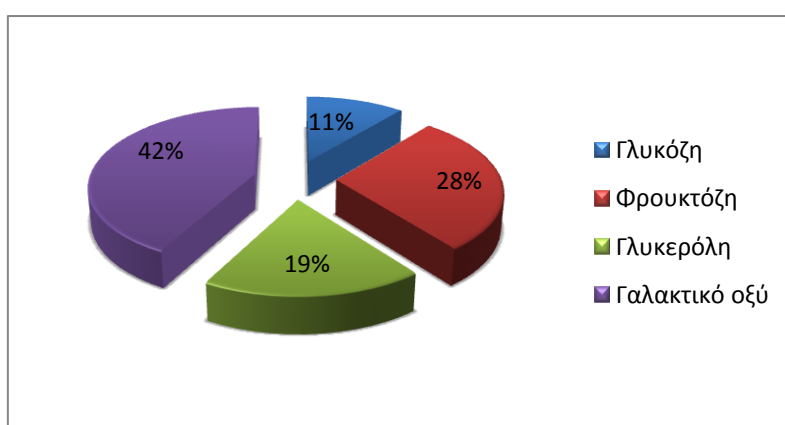
Όπως προκύπτει λοιπόν από τα πιο πάνω αποτελέσματα, Θα μπορούσαμε να πούμε ότι επιβεβαιώνεται η διαπίστωση των Kristensen et al. (2007), καθώς η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης φαίνεται να επηρεάζεται θετικά από την προσθήκη των επιφανειοδραστικών ουσιών. Στους βοστρύχους παράχθηκαν 21,8 g γλυκόζης/100g στερεού, που σημαίνει ότι η μετατροπή ήταν κατά 43% αποδοτικότερη σε σχέση με την περίπτωση που δεν προστέθηκε κάποια επιφανειοδραστική ουσία.. Αντίστοιχα στα στέμφυλα-γίγαρτα με την προσθήκη των επιφανειοδραστικών ουσιών επετεύχθη κατά 80% υψηλότερη μετατροπή σε γλυκόζη. Τέλος, η ενζυμική υδρόλυση του μίγματος βοστρύχων-στεμφύλων-γιγάρτων με την προσθήκη μη ιονικού επιφανειοδραστικού έδωσε περίπου 20g γλυκόζης ανά 100g βοστρύχων (Σχήμα 21).



**Σχήμα 21:** Επίδραση της προσθήκης επιφανειοδραστικών ουσιών στην ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης των βοστρύχων, των στεμφύλων-γιγάρτων και μίγματος αυτών με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 100g/L.

### 4.3. Οινολάσπη

Η οινολάσπη, είναι πλούσια πηγή αζώτου λόγω των κυττάρων των ζυμομυκήτων που απέμειναν από την διαδικασία παραγωγής οίνου. Μετά την υδρόλυση της οινολάσπης που πραγματοποιήθηκε με χρήση των πρωτεολυτικών ενζύμων καθώς και με χρήση του υγρού που παραλήφθηκε μετά από τη φυγοκέντρηση της οινολάσπης και απόσταξης του (κεφάλαιο 3.4.), έγινε η αξιοποίηση της ως θρεπτικό μέσο ζύμωσης. Το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) του υδρολύματος οινολάσπης υπολογίστηκε στα 560mg/L. Η σύσταση της οινολάσπης παρουσιάζεται στο Σχήμα 22.



**Σχήμα 22:** Σύσταση υδρολύματος οινολάσπης.

### 4.4. Ζυμώσεις διαλείποντος έργου

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι η αξιοποίηση των αποβλήτων οινοποιείου για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Μέσα από τις φυσικοχημικές αναλύσεις που έλαβαν χώρα προκειμένου να προσδιοριστεί η σύσταση των αποβλήτων αυτών, αποδείχτηκε ότι αποτελούν πηγή λιπαρών υλών, πρωτεϊνών, αντιοξειδωτικών και φυτικών ινών. Από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης προέκυψε ένα διάλυμα πλούσιο σε μονοσακχαρίτες το οποίο θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως πηγή άνθρακα σε μικροβιακές ζυμώσεις. Με τη υδρόλυση της οινολάσπης προέκυψε ένα υπόστρωμα πλούσιο σε άζωτο και ιχνοστοιχεία το οποίο θα μπορούσε να αντικαταστήσει το εμπορικό εκχύλισμα ζύμης (yeast extract). Σε τελικό, λοιπόν, στάδιο, τα δύο αυτά υδρολύματα χρησιμοποιήθηκαν για τη



μικροβιακή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με το βακτήριο *Actinobacillus succinogenes* 130Z.

#### **4.4.1. Ρύθμιση συνθηκών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης**

Η βέλτιστη περιοχή pH για την ανάπτυξη του βακτηρίου *A. succinogenes* είναι μεταξύ 6,0 και 7,2 με το 6,8 να αποτελεί τη βέλτιστη τιμή (Wan et al., 2008). Όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία κάτω από τιμή pH 6,0 μειώνεται σημαντικά η ανάπτυξη των κυττάρων λόγω της αυξημένης ανάγκης για συντήρηση (Lee et al., 2002).

Τόσο το κύριο προϊόν της ζύμωσης που είναι το ηλεκτρικό οξύ όσο και τα παραπροϊόντα όπως το μυρμηκικό, το οξικό και το γαλακτικό οξύ λόγω του ότι είναι οξέα συμβάλλουν στην μείωση του pH της ζύμωσης. Για το λόγο αυτό, πρέπει να ρυθμίζεται το pH ώστε να διατηρηθεί η τιμή του κοντά στη βέλτιστη, πράγμα το οποίο επιτύχαμε μέσω της προσθήκης  $MgCO_3$  το οποίο δρα εξουδετερώνοντας τα παραγόμενα οξέα (pH neutralizer) προς παραγωγή των αντίστοιχων αλάτων μαγνησίου (McKinlay et al., 2007-a).

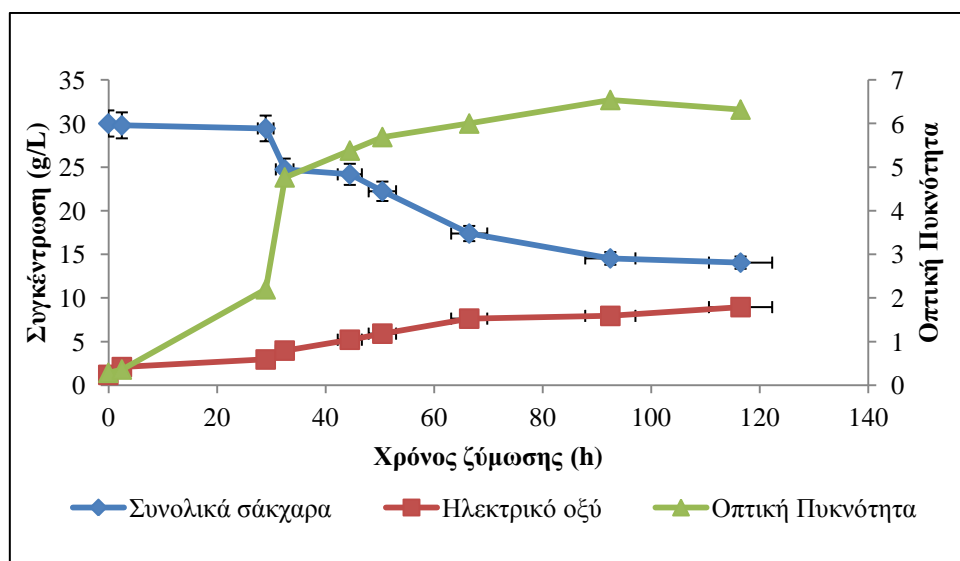
#### **4.4.2. Ζυμώσεις με θρεπτικό υπόστρωμα το υδρόλυμα ημικυτταρίνης από τα απόβλητα οινοποιείου**

Η ικανότητα του *A. succinogenes* να αναπτύσσεται και να παράγει ηλεκτρικό οξύ στα υδρόλυματα από τα απόβλητα οινοποιείου μελέτηθηκε σε δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων: 30 g/L και 45 g/L.

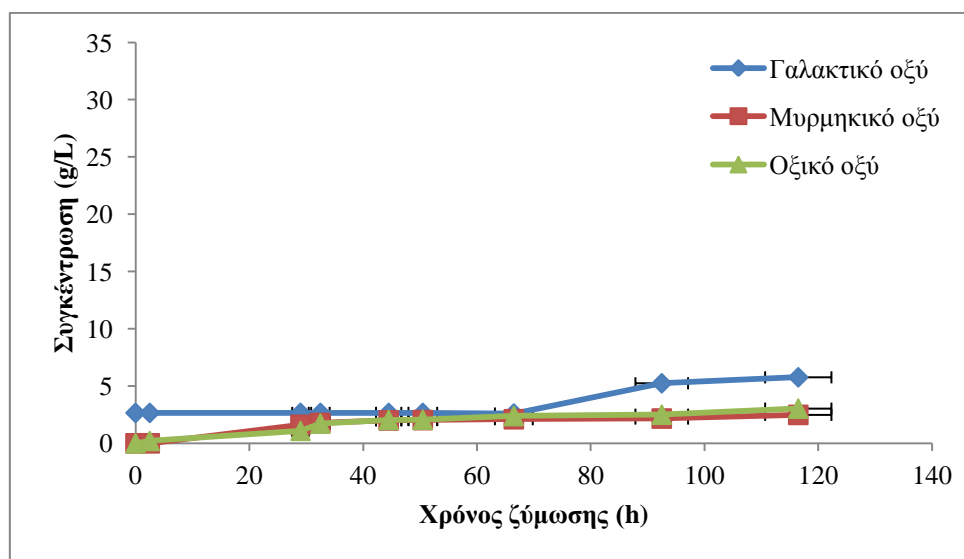
##### **A) Ζύμωση διαλείποντος έργου με 30 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων**

Στο Σχήμα 23 παρουσιάζεται η κατανάλωση των σακχάρων, η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος καθώς επίσης η μικροβιακή αύξηση, εκφρασμένη ως οπτική πυκνότητα, συναρτήσει του χρόνου. Παρατηρείται ότι τις πρώτες 29 ώρες της ζύμωσης ο ρυθμός κατανάλωσης των σακχάρων ήταν πολύ χαμηλός της τάξης των 0,06 g/Lh. Αυτό το χρονικό διάστημα αντιστοιχεί στο χρόνο που χρειάστηκε ο

μικροοργανισμός για να προσαρμοστεί στο συγκεκριμένο υπόστρωμα (φάση προσαρμογής). Η ζύμωση διήρκησε 116 ώρες με τελική συγκέντρωση παραγόμενου ηλεκτρικού οξέος τα **7,8 g/L** με απόδοση 0,49 %. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, μέγιστη παραγωγικότητα (0,097 g/L.h) σημειώθηκε στο διάστημα των 45 έως 70 ωρών, ενώ στο πέρας της ζύμωσης ήταν 0,07 g/L.h. Έπειτα από 90 ώρες ζύμωσης παράχθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις παραπροϊόντων: 3 g/L οξικού οξέος, 2,48 g/L μυρμηκικού οξέος και 3,1 g/L γαλακτικού οξέος (Σχήμα 24).



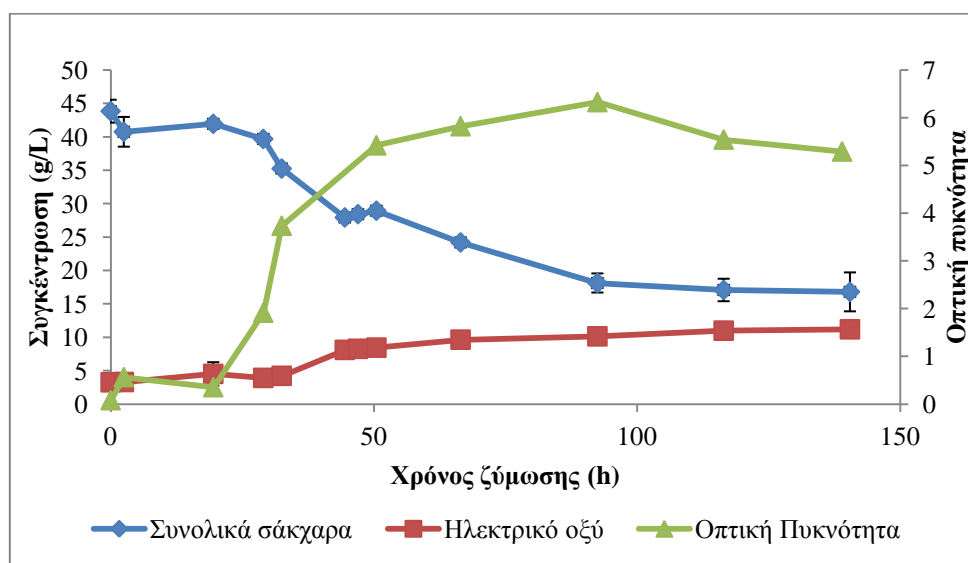
**Σχήμα 23:** Συγκέντρωση ολικών σακχάρων, ηλεκτρικού οξέος και οπτική πυκνότητα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.



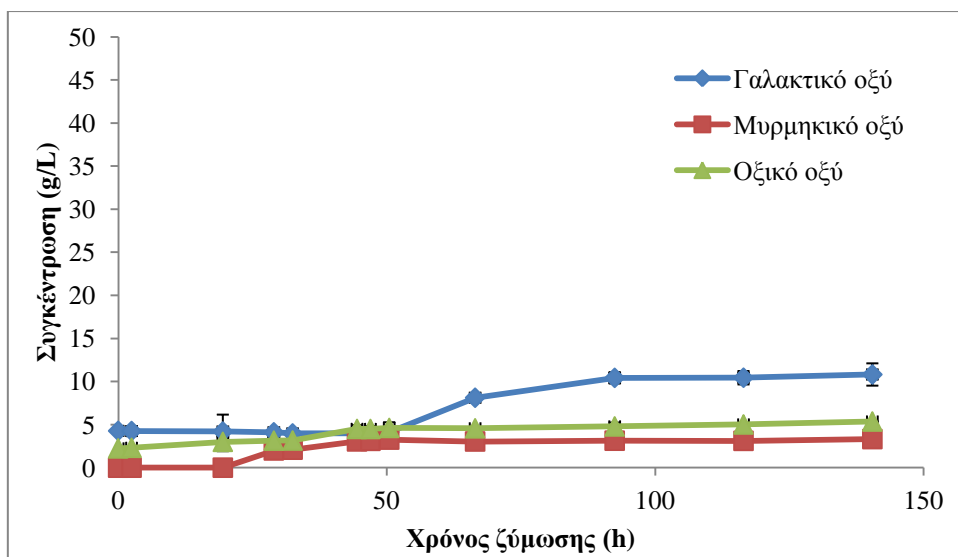
**Σχήμα 24:** Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

## B) Ζύμωση διαλείποντος έργου με 45 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε υδρόλυμα ημικυτταρίνης αποβλήτων οινοποιείου με αρχικά σάκχαρα περίπου 45 g/L. Η ζύμωση διήρκεσε 140 ώρες με παραγόμενο ηλεκτρικό οξύ 7,93 g/L και απόδοση 0,29 %. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η μέγιστη παραγωγικότητα της τάξης των 0,11 g/Lh σημειώθηκε στο διάστημα των 45 έως 67 ωρών ενώ στις 140 ώρες ζύμωσης ήταν 0,06 g/Lh. Όσον αφορά την παραγωγή των παραπροϊόντων μετά τις 45 ώρες σημειώθηκε αύξηση της συγκέντρωσής τους όπου τελικά έφτασε τις εξής: 3,1 g/L οξικού οξέος, 3,3 g/L μυρμηκικού οξέος και 6,5 g/L γαλακτικού οξέος. Στη συνέχεια παρατίθενται τα Σχήματα 25 και 26 της ζύμωσης που παρέχουν πληροφορίες για την κατανάλωση των σακχάρων, την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από τον μικροοργανισμό *A. succinogenes* αλλά και των παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης καθώς και την οπτική πυκνότητα του διαλύματος η οποία αποτυπώνει την μικροβιακή ανάπτυξη.



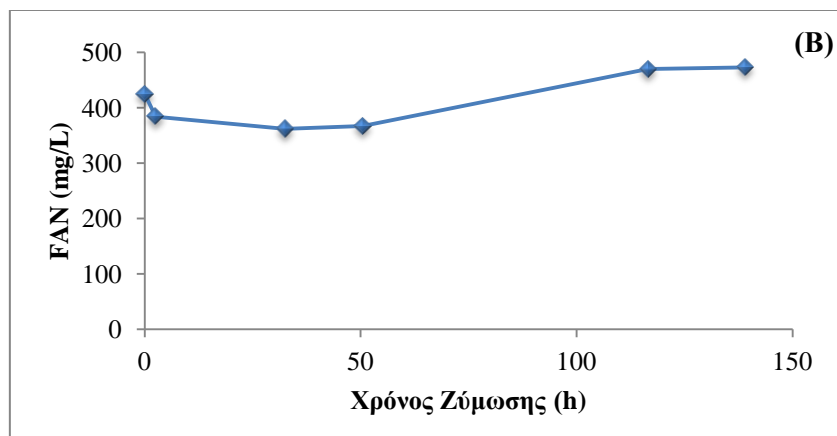
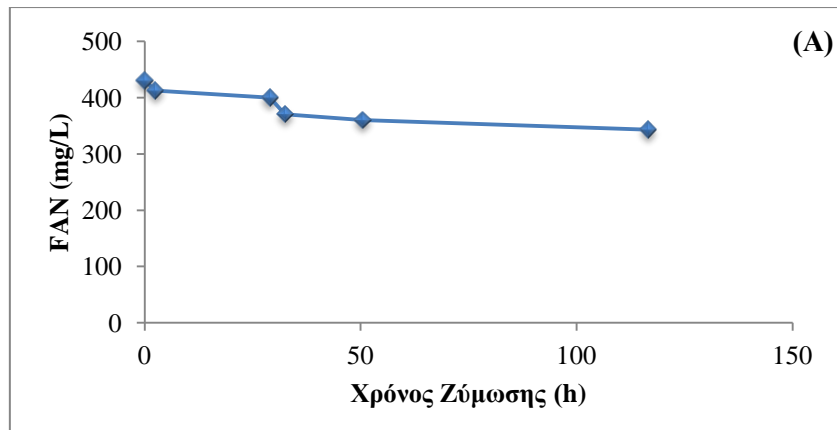
**Σχήμα 25:** Συγκέντρωση ολικών σακχάρων, ηλεκτρικού οξέος και οπτική πυκνότητα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.



**Σχήμα 26:** Συγκέντρωση παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Και στις δυο περιπτώσεις το μεγαλύτερο ποσοστό των καταναλωθέντων σακχάρων μετατρέπεται σε ηλεκτρικό οξύ, ενώ σημειώνεται και παραγωγή παραπροϊόντων σε μικρότερες ποσότητες και πιο συγκεκριμένα του οξικού οξέος, του μυρμηκικού και του γαλακτικού οξέος. Τα παραπροϊόντα μπορούν να περιορίσουν την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, με αποτέλεσμα να μειώνεται η απόδοση του επιθυμητού κύριου προϊόντος (Huh et al., 2006).

Το άζωτο των ελευθέρων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (Σχήμα 27) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μειώνεται σε πολύ μικρό βαθμό. Αυτό σημαίνει ότι ο *A. succinogenes* χρειάζεται μικρή ποσότητα FAN για να παράξει βιομάζα. Σε γενικές γραμμές στην ζύμωση όπου η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν στα 30 g/L παρατηρήθηκε μια μικρή κατανάλωση, της τάξης του 20%. Αντίθετα, στη ζύμωση με 45 g/L σημειώθηκε μια κατανάλωση της τάξης του 15% τις πρώτες 50 ώρες ενώ προς το τέλος της ζύμωσης υπήρχε αύξηση της τιμής της FAN κατά 10%. Η αύξηση αυτή κατά το τελικό στάδιο της ζύμωσης θα μπορούσε να δικαιολογηθεί με το θάνατο των κυττάρων και την αυτόλυσή τους.



**Σχήμα 27:** Κατανάλωση αζώτου των ελευθέρων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων με αρχικά σάκχαρα (A) 30g/L και (B) 45g/L.

Στον Πίνακα 11 παραθέτονται βιβλιογραφικές μελέτες, που αναφέρονται στην αξιοποίηση υδρολυμάτων ημικυτταρίνης λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων, καθώς και καθαρών σακχάρων (ξυλόζη, γλυκόζη) προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από τον μικροοργανισμό *Actinobacillus succinogenes*.

**Πίνακας 11:** Βιβλιογραφικές αναφορές παραγωγής ηλεκτρικού οξέος.

<b>Πηγή άνθρακα</b>	<b>Αρχικά σακχάρα (g/L)</b>	<b>Y<sub>SA/S</sub> (g/g)</b>	<b>Βιβλιογραφική αναφορά</b>
Ξυλόζη	22	0,64	Borges & Pereira (2011)
Γλυκόζη	66,4	0,67	Song & Lee (2006)
Υδρόλυμα ημικυτ. (βαγάσση σακχαροκάλαμου)	52	0,43	Borges & Pereira (2011)
Υδρόλυμα ημικυτ. (στάχυ καλαμποκιού)	30,52	0,49	Yu et al. (2010)
Υδρόλυμα ημικυτ. (στάχυ καλαμποκιού)	38,07	0,58	Yu et al. (2010)

Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε υπόστρωμα μονοσακχαριτών του εμπορίου είχαν σαφώς υψηλότερη απόδοση σε σύγκριση με τις ζυμώσεις που για θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν υδρολύματα ημικυτταρίνης. Οι Yu et al. (2010) πραγματοποίησαν χημική υδρόλυση σε στάχυ καλαμποκιού και το υδρόλυμα ημικυτταρίνης που παράχθηκε χωρίς καμία περαιτέρω επεξεργασία του υδρολύματος χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Η πηγή αζώτου ήταν εκχύλισμα ζυμών. Το βακτήριο *A. succinogenes* με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30,52 g/L είχε απόδοση σε ηλεκτρικό οξύ 0,49 g/g, και με αρχική συγκέντρωση λίγο παραπάνω αρχικών σακχάρων (38,07 g/L) είχε απόδοση 0,58 g/g. Η ζύμωση διήρκησε 48 ώρες. Οι Borges & Pereira (2011) αρχικά πραγματοποίησαν ζυμώσεις χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα καθαρή ξυλόζη και έπειτα επεξεργάστηκαν απόβλητο βαγάσσης ζαχαροκάλαμου με ήπια χημική υδρόλυση και το υδρόλυμα, πλούσιο σε ξυλόζη, το αξιοποίησαν προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με πηγή αζώτου εκχύλισμα ζυμών. Πιο συγκεκριμένα, σε 24 ώρες ζύμωσης, σε υπόστρωμα 22 g/L ξυλόζης η απόδοση μετατροπής της ξυλόζης σε προϊόν ήταν 0,64 g/g, ενώ σε υπόστρωμα σακχάρων 52 g/L του υδρολύματος ημικυτταρίνης η απόδοση ήταν πολύ χαμηλότερη (0,49 g/g). Με υψηλότερη συγκέντρωση αρχικών σακχάρων παράχθηκε μικρότερη ποσότητα ηλεκτρικού οξέος, και ο λόγος αυτού είναι η ύπαρξη παρεμποδιστών της ζύμωσης. Στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη με χρήση υποστρώματος υδρολύματος

ημικυτταρίνης αποβλήτων οινοποιίας με συγκέντρωση 30 g/L η απόδοση ήταν αντίστοιχη με αυτή της βιβλιογραφίας καθώς έφτασε 0,49 g/g. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η πηγή αζώτου στις ζυμώσεις αυτές ήταν υδρόλυμα οινολάσπης. Η ζύμωση αν και είχε μεγαλύτερη διάρκεια, επετεύχθη ο στόχος για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Στη ζύμωση με θρεπτικό υπόστρωμα 45 g/L σακχάρων η απόδοση ήταν πολύ χαμηλότερη, καθώς μετά το πέρας 140 ωρών η απόδοση ήταν 0,29 g/g. Το συγκεκριμένο υδρόλυμα πριν την αξιοποίηση του ως πηγή άνθρακα στις ζυμώσεις συμπυκνώθηκε, επομένως μαζί με τη συμπύκνωση των σακχάρων, συμπυκνώθηκαν επίσης και ουσίες που μπορούν να δράσουν παρεμποδιστικά στον μικροοργανισμό. Τέτοιες ουσίες πιθανόν να είναι και οι φαινολικές ενώσεις. Παραλληλίζοντας τα δεδομένα της βιβλιογραφίας με αυτά της παρούσας μελέτης, συγκρίνοντας την ζύμωση των Borges & Pereira (2011) με αρχικά σάκχαρα 52 g/L και τη ζύμωση των Yu et al. (2012) με αρχικά σάκχαρα 30,52 g/L, προκύπτει το συμπέρασμα ότι υψηλή συγκέντρωση σακχάρων δεν ευνοεί τη ζύμωση για παραγωγή υψηλότερων συγκεντρώσεων ηλεκτρικού οξέος. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη, καθώς πιθανόν να προκαλείται παρεμπόδιση υποστρώματος.

Συμπερασματικά, από τα πειραματικά αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι με χρήση επεξεργασμένων αποβλήτων οινοποιίας είναι δυνατόν να παραχθούν προϊόντα προστιθέμενης αξίας.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών αναλύσεων για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των στερεών αποβλήτων οινοποιίας έδειξαν πως οι βόστρυχοι και το μίγμα στεμφύλων-γιγάρτων είχαν παρόμοια σύσταση. Τα στέμφυλα-γίγαρτα είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λιπαρές ύλες. Το γεγονός αυτό ευνοεί την αξιοποίηση τους σε πληθώρα εφαρμογών. Πιο συγκεκριμένα, τα γίγαρτα από τα οποία εκχυλίζεται το γιγαρτέλαιο – το οποίο είναι πλούσιο σε λινελαϊκό οξύ-αποτελούν προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Χαρακτηριστική επίσης είναι η υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μιας και κατατάσσονται στα πολύ ισχυρά αντιοξειδωτικά (AAI>2), ειδικά οι βόστρυχοι με AAI ίση με 11. Το μίγμα στεμφύλων-γιγάρτων λόγω της συμμετοχής του στην ερυθρή οινοποίηση για εκχύλιση των χρωστικών έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλότερη περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ουσίες καθώς και τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

Όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε λιγνοκυτταρινούχα συστατικά, η λιγνίνη επικρατεί στους βοστρύχους, μιας και οι βόστρυχοι αποτελούν το ξυλώδες μέρος του τσαμπιού, ενώ στο μίγμα στεμφύλων-γιγάρτων εντοπίζεται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα, μιας και μόνο τα γίγαρτα συνεισφέρουν στο ποσοστό αυτό. Όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, τα ποσοστά τους είναι παραπλήσια. Η υψηλή τους περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες - κυτταρίνη, ημικυτταρίνη - αποτέλεσε το έναυσμα για τις περαιτέρω υδρολύσεις με στόχο να χρησιμοποιηθούν ως θρεπτικό υπόστρωμα σε ζυμώσεις. Στις ενζυμικές υδρολύσεις η προσθήκη επιφανειοδραστικών ουσιών αύξησε την απόδοση της βιομετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη, καθώς παρεμποδίστηκε η προσρόφηση των κυτταρινασών από την υπολειπόμενη λιγνίνη των αποβλήτων.

Η δημιουργία της οινολάσπης στον πυθμένα των δεξαμενών ερυθρής οινοποίησης είναι επίσης απόβλητο προς αξιοποίηση. Δυναμική προοπτική αξιοποίησης υδρολυμάτων πλούσιων σε αζωτούχες ενώσεις, είναι να αντικαταστήσουν τις επικρατέστερες πηγές αζώτου όπως είναι το εκχύλισμα ζύμης. Στην παρούσα μελέτη ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε το υδρόλυμα της οινολάσπης καθώς είναι πλούσιο σε αζωτούχες ενώσεις λόγω των ζυμομυκητών.



Τελικά, με χρήση ως θεραπευτικό μέσο το υδρόλυμα ημικυτταρίνης των βοστρύχων και στεμφύλων-γιγάρτων (πηγή άνθρακα) και το υδρόλυμα της οινολάσπης (πηγή αζώτου), έλαβαν χώρα ζυμώσεις με το βακτήριο *A. succinogenes* προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Ο στόχος αυτός επετεύχθη καθώς με 30 g/L αρχικά σάκχαρα και 400 mg/L FAN παράχθηκαν 7,8 g/L ηλεκτρικού οξέος. Ζύμωση με υψηλότερη συγκέντρωση αρχικών σακχάρων επίσης διεξήχθη, ωστόσο η παραγωγή του προϊόντος κυμάνθηκε στις ίδιες συγκεντρώσεις (7,93 g/L). Η χαμηλότερη απόδοση προϊόντος σε υψηλότερη συγκέντρωση αρχικών σακχάρων πιθανόν να οφείλεται σε ύπαρξη υψηλότερης συγκέντρωσης παρεμποδιστών (π.χ. φαινολικές ενώσεις) καθώς επίσης και σε παρεμπόδιση εκ του υποστρώματος. Περαιτέρω μελέτη απαιτείται για διευκρίνηση των αιτιών.

Σε γενικές γραμμές είναι απαραίτητη η αξιοποίηση των παραπροϊόντων της οινοποίησης προς παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Το ηλεκτρικό οξύ είναι μια χρήσιμη χημική ουσία με πληθώρα εφαρμογών σε διάφορους βιομηχανικούς κλάδους. Η βιολογική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από ανανεώσιμες πρώτες ύλες με ταυτόχρονη κατανάλωση διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) αποτελεί πρόκληση με σκοπό να αντικατασταθεί η παραγωγή του από πετροχημικές ουσίες.

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **6.1. Ξένη Βιβλιογραφία**

- Acid Detergent Fibre (ADF) in feed, D.7.c. FibreBag System - ADF in Feed, Gerhardt Amendola, D., De Faveri, D., Egües, I., Serrano, L., Labidi, J., & Spigno, G. (2012). Autohydrolysis and organosolv process for recovery of hemicelluloses, phenolic compounds and lignin from grape stalks. *Bioresource Technology*, 107, 267-274.
- Ani, V., Varadaraj, M., & Naidu, K. A. (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cummin (*Cuminum nigrum* L.). *European Food Research and Technology*, 224(1), 109-115.
- AOAC Official Method 973.18, Fiber (Acid Detergent) and Lignin (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in Animal Feed.
- Beauprez, J. J., De Mey, M., & Soetaert, W. K. (2010). Microbial succinic acid production: natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochemistry*, 45(7), 1103-1114.
- Becker, J., Reinefeld, J., Stellmacher, R., Schäfer, R., Lange, A., Meyer, H., Schröder, H. (2013). Systems-wide analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in bio-succinate producing *Basfia succiniciproducens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(11), 3013-3023.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. (2014). *Χημεία Τροφίμων*, 4η Έκδοση, Εκδ. Τζιόλα.
- Borges, E. R., & Pereira Jr, N. (2011). Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(8), 1001-1011.
- Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(2), 135-141.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research*, 2011.

- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica chimica acta*, 732, 100-104.
- Castaneda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.
- Çetin, E. S., Altinöz, D., Tarçan, E., & Baydar, N. G. (2011). Chemical composition of grape canes. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 994-998.
- Chandel, A. K., Antunes, F. A., de Arruda, P. V., Milessi, T. S., da Silva, S. S., & de Almeida Felipe, M. d. G. (2012). Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: state-of-the-art D-Xylitol (pp. 39-61): Springer.
- Cheng, K. K., Zhao, X. B., Zeng, J., & Zhang, J. A. (2012). Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 302-318.
- Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., & Teissedre, P.-L. (2008). Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(2), 545-553.
- Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., & Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(7), 1012-1018.
- Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical journal*, 91(1), 107-110.
- Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(4), 1076-1080.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.

- Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44(9), 2712-2720.
- Dominguez, J. M., Cao, N., Gong, C., & Tsao, G. (1997). Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. *Bioresource Technology*, 61(1), 85-90.
- Dorado, M. P., Lin, S. K. C., Koutinas, A., Du, C., Wang, R., & Webb, C. (2009). Cereal-based biorefinery development: utilisation of wheat milling by-products for the production of succinic acid. *Journal of Biotechnology*, 143(1), 51-59.
- Dwyer, K., Hosseinian, F., & Rod, M. (2014). The Market Potential of Grape Waste Alternatives. *Journal of Food Research*, 3(2).
- Elzaawely, A. A., Xuan, T. D., & Tawata, S. (2007). Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt. & RM Sm. and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 103(2), 486-494.
- EN ISO 13906:2008, Animal feeding stuffs – Determination of acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL) contents – [www.iso.org/www.cen.eu](http://www.iso.org/www.cen.eu)
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchos, A., & Aggelis, G. (2009). Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy*, 33(4), 573-580.
- Fan, L.-t., Gharpuray, M. M., & Lee, Y.-H. (2012). *Cellulose hydrolysis (Vol. 3): Springer Science & Business Media*.
- Faustino, H., Gil, N., Baptista, C., & Duarte, A. P. (2010). Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. *Molecules*, 15(12), 9308-9322.
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68-87.
- Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., & Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*,

107(3), 1120-1130.

- Glassner, D. A., & Datta, R. (1992). Anaerobic fermentation, electro dialysis, ion exchange: Google Patents.
- González-Centeno, M., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M., López, F., & Femenia, A. (2010). Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT-Food Science and Technology*, 43(10), 1580-1586.
- González-Paramás, A. M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., de Pascual-Teresa, S., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(2), 234-238.
- Guettler, M. V., Rumler, D., & Jain, M. K. (1999). *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International journal of systematic bacteriology*, 49(1), 207-216.
- Harbertson, J. F., Kennedy, J. A., & Adams, D. O. (2002). Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(1), 54-59.
- Huh, Y. S., Jun, Y.-S., Hong, Y. K., Song, H., Lee, S. Y., & Hong, W. H. (2006). Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. *Process Biochemistry*, 41(6), 1461-1465.
- Jantama, K., Zhang, X., Moore, J., Shanmugam, K., Svoronos, S., & Ingram, L. (2008). Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(5), 881-893.
- Jayaprakasha, G., Selvi, T., & Sakariah, K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36(2), 117-122.
- Jayaprakasha, G., Singh, R., & Sakariah, K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73(3), 285-290.
- Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Garcia, I. L., Kookos, I. K., 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(8), 2587-2627.
- Kristensen, J. B., Börjesson, J., Bruun, M. H., Tjerneld, F., & Jørgensen, H. (2007).

- Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 888-895.
- Lachman, I. M., Patil, M. D., Socha Jr, L. S., Swaroop, S. H., & Wusirika, R. R. (1994). Process for removal of hydrocarbons carbon monoxide, and oxides of nitrogen from oxygen-containing waste gas using molecular sieve-palladium-platinum catalyst on a substrate: Google Patents.
- Lafka, T.-I., Sinanoglou, V., & Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104(3), 1206-1214.
- Lee, P., Lee, S., Hong, S., & Chang, H. (2002). Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(5), 663-668.
- Lee, P. C., Lee, W. G., Kwon, S., Lee, S. Y., & 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(8), 549-554.
- Lee, S. Y., Kim, J. M., Song, H., Lee, J. W., Kim, T. Y., & Jang, Y.-S. (2008). From genome sequence to integrated bioprocess for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(1), 11-22.
- Li, J., Zheng, X.-Y., Fang, X.-J., Liu, S.-W., Chen, K.-Q., Jiang, M., Ouyang, P.-K. (2011). A complete industrial system for economical succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 102(10), 6147-6152.
- Li, X., Wu, X., & Huang, L. (2009). Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of radix *Angelicae sinensis* (Danggui). *Molecules*, 14(12), 5349-5361.
- Lie, S. (1973). The EBC-Ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37-41.
- Lim, W.-S., & Lee, J.-W. (2013). Influence of pretreatment condition on the fermentable sugar production and enzymatic hydrolysis of dilute acid-pretreated mixed softwood. *Bioresource Technology*, 140, 306-311.

- Liu, Y.-P., Zheng, P., Sun, Z.-H., Ni, Y., Dong, J.-J., & Zhu, L.-L. (2008). Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 99(6), 1736-1742.
- Llobera, A., & Cañellas, J. (2007). Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry*, 101(2), 659-666.
- Lorenzo, M., Moldes, D., Couto, S. R., & Sanroman, A. (2002). Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, 82(2), 109-113.
- Lloyd, P. J. D. (2004). *Principles of Industrial Solvent Extraction*. Chapter 8. Taylor & Francis Group, LLC. Rondebosch, South Africa.
- Martínez, M., Miralles, N., Hidalgo, S., Fiol, N., Villaescusa, I., & Poch, J. (2006). Removal of lead (II) and cadmium (II) from aqueous solutions using grape stalk waste. *Journal of Hazardous Materials*, 133(1), 203-211.
- McKinlay, J. B., Laivenieks, M., Schindler, B. D., McKinlay, A. A., Siddaramappa, S., Challacombe, J. F., Burkhart, K. B. (2010). A genomic perspective on the potential of *Actinobacillus succinogenes* for industrial succinate production. *BMC genomics*, 11(1), 680.
- McKinlay, J. B., Shachar-Hill, Y., Zeikus, J. G., & Vieille, C. (2007-a). Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of 13 C-labeled metabolic product isotopomers. *Metabolic engineering*, 9(2), 177-192.
- McKinlay, J. B., & Vieille, C. (2008). 13 C-metabolic flux analysis of *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism at different NaHCO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub> concentrations. *Metabolic engineering*, 10(1), 55-68.
- McKinlay, J. B., Vieille, C., & Zeikus, J. G. (2007-b). Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(4), 727-740.
- Mendes, J. A., Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., & Lopes, L. P. C. (2013). Towards comprehensive utilization of winemaking residues: Characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional. *Industrial Crops and Products*, 43, 25-32.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl

- (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2), 211-219.
- Muzumdar, A. V., Sawant, S. B., & Pangarkar, V. G. (2004). Reduction of maleic acid to succinic acid on titanium cathode. *Organic process research & development*, 8(4), 685-688.
- Negi, S., & Banerjee, R. (2006). Optimization of amylase and protease production from *Aspergillus awamori* in single bioreactor through EVOP factorial design technique. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 257-261.
- Negro, C., Tommasi, L., & Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87(1), 41-44.
- Nerantzis, E., & Tataridis, P. (2006). Integrated enology-utilisation of winery by-products into high added value products. *J. Sci. Tech*, 1, 79-89.
- Öner, M., & Akar, B. (1993). Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilization in gaziantep cheese production. *LWT-Food Science and Technology*, 26(4), 125-156.
- Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., & Tenkanen, M. (2004). Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*, 107(1), 65-72.
- Pascal, R., Glories, Y., Denis, D., & Maujean, A. (2006). *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*: England: John Wiley and Sons.
- Pérez-Serradilla, J., & De Castro, M. L. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry*, 111(2), 447-456.
- Perry, R. H., Green, D., & Maloney, J. (1997). *Perry's handbook of chemical engineering*. Perry's Handbook of Chemical Engineering.
- Ping, L., Brosse, N., Sannigrahi, P., & Ragauskas, A. (2011-a). Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial Crops and Products*, 33(1), 200-204.
- Ping, L., Pizzi, A., Guo, Z. D., & Brosse, N. (2011-b). Condensed tannins extraction from grape pomace: characterization and utilization as wood adhesives for wood particleboard. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 907-914.
- Poldermans, B. (1990). *Proteolytic enzymes* (pp. 108-123): VCH Publishers, Weinheim, Germany.
- Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., & Lopes, L. P. C. (2012). Chemical composition of



- grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 178-184.
- Salgado, J. M., Rodríguez, N., Cortés, S., & Domínguez, J. M. (2010). Improving downstream processes to recover tartaric acid, tartrate and nutrients from vinasses and formulation of inexpensive fermentative broths for xylitol production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(13), 2168-2177.
- Samuelov, N., Lamed, R., Lowe, S., & Zeikus, J. (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(10), 3013-3019.
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), 654-658.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2005). Determination of extractives in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, 1617.
- Song, H., & Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 352-361.
- Sousa, E. C., Uchôa-Thomaz, A. M. A., Carioca, J. O. B., Morais, S. M. d., Lima, A. d., Martins, C. G., . . . Rodrigues, S. P. (2014). Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(1), 135-142.
- Spigno, G., & De Faveri, D. M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 793-801.
- Spigno, G., Pizzorno, T., & De Faveri, D. M. (2008). Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. *Bioresource Technology*, 99(10), 4329-4337.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2013). *Principles of fermentation technology*: Elsevier.
- Suliman, A. M. E., Khodari, K. M., & Salih, Z. A. (2013). Extraction of Pectin from Lemon and Orange Fruits Peels and its Utilization in Jam Making. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 3(5), 81-84.
- Sun, R., Lawther, J. M., & Banks, W. (1995). Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. *Industrial Crops and Products*, 4(2),

127-145.

- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *International journal of molecular sciences*, 15(9), 15638-15678.
- Urbance, S. E., Pometto III, A. L., DiSpirito, A. A., & Demirci, A. (2003). Medium evaluation and plastic composite support ingredient selection for biofilm formation and succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Food Biotechnology*, 17(1), 53-65.
- Van der Werf, M. J., Guettler, M. V., Jain, M. K., & Zeikus, J. G. (1997). Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Archives of Microbiology*, 167(6), 332-342.
- Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M., González-Álvarez, J., & Antorrena, G. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 279-285.
- Villaescusa, I., Fiol, N., Martínez, M. a., Miralles, N., Poch, J., & Serarols, J. (2004). Removal of copper and nickel ions from aqueous solutions by grape stalks wastes. *Water Research*, 38(4), 992-1002.
- Vlyssides, A., Barampouti, E., & Mai, S. (2005). Wastewater characteristics from Greek wineries and distilleries. *Water Science & Technology*, 51(1), 53-60.
- Wan, C., Li, Y., Shahbazi, A., & Xiu, S. (2008). Succinic acid production from cheese whey using *Actinobacillus succinogenes* 130 Z. *Applied biochemistry and biotechnology*, 145(1-3), 111-119.
- Werpy, T., Petersen, G., Aden, A., Bozell, J., Holladay, J., White, J., . . . Jones, S. (2004). Top value added chemicals from biomass. Volume 1-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas: DTIC Document.
- Yang, B., & Wyman, C. E. (2006). BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(4), 611-617.

- Yu, J., Li, Z., Ye, Q., Yang, Y., & Chen, S. (2010). Development of succinic acid production from corncob hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(10), 1033-1040.
- Zeikus, J., Jain, M., & Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(5), 545-552.
- Zhang, J., Tang, M., & Viikari, L. (2012). Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. *Bioresource Technology*, 121, 8-12.
- Zhang, Y. P., Hong, J., & Ye, X. (2009). *Cellulase assays Biofuels* (pp. 213-231): Springer.
- Zheng, P., Dong, J.-J., Sun, Z.-H., Ni, Y., & Fang, L. (2009). Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 100(8), 2425-2429.
- Zhang, SG., and Zhang, W., *Manual of Fine Chemicals and Intermediates*. 1st ed. Chemical Industry Press, Beijing, China (2004).
- Zheng, P., Dong, J.-J., Sun, Z.-H., Ni, Y., & Fang, L. (2009). Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 100(8), 2425-2429.
- Zhihui, B., Bo, J., Yuejie, L., Jian, C., & Zuming, L. (2008). Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Sciences*, 20(3), 353-358.

## 6.2. Ελληνική Βιβλιογραφία

- Γαλιώτου-Παναγιώτου, Μ. (2006). *Ενζυμολογία Τροφίμων*, Πανεπιστημιακές Παραδόσεις Γ.Π.Α., Αθήνα.
- Καν. (ΕΚ) 479/08 του Συμβουλίου για την κοινή οργάνωση της αμπελοοινικής αγοράς, την τροποποίηση των καν. (ΕΚ) αριθ. 1493/99, (ΕΚ) αριθ. 1782/03, (ΕΚ) αριθ. 1290/05, (ΕΚ) αριθ. 3/08 & την κατάργηση των καν. (ΕΟΚ) αριθ. 2392/86 & (ΕΚ) αριθ. 1493/99.
- Κοτσερίδης, Γ. (2005). *Οινολογία I & II*, Αθήνα.
- Κουράκου-Δραγώνα, Σ. (1998). *Θέματα οινολογίας*, Εκδόσεις Τροχαλία.
- Σουφλερός, Ε. Ηρ. (1997). *Οινολογία: Επιστήμη και Τεχνογνωσία*. Τόμος I.

Θεσσαλονίκη.

Σπινθηροπούλου Χ. (2000). Οινοποιήσιμες ελληνικές ποικιλίες του ελληνικού αμπελώνα, Αθήνα.

Τσακίρης, Α. (1998). Οινολογία από το σταφύλι στο κρασί.