ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Παραγωγή βιογενών χρωστικών ουσιών μέσω μικροβιακής ζύμωσης, με τη χρήση του μύκητα *Penicillium purpurogenum*

Μαρία Ε. Παπαδοπούλου

Επιβλέπων καθηγητής
Κουτίνας Απόστολος

ΑΘΗΝΑ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Παραγωγή βιογενών χρωστικών ουσιών μέσω μικροβιακής ζύμωσης, με τη χρήση του μύκητα *Penicillium purpurogenum*

Μαρία Ε. Παπαδοπούλου

Επιβλέπων καθηγητής
Κουτίνας Απόστολος

ΑΘΗΝΑ 2018

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Παραγωγή βιογενών χρωστικών ουσιών μέσω μικροβιακής ζύμωσης, με τη χρήση του μύκητα *Penicillium purpurogenum*

Μαρία Ε. Παπαδοπούλου

Επιβλέπων καθηγητής
Κουτίνας Απόστολος

Εξεταστική επιτροπή

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής

Μαντάλα Ιωάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Στοφόρος Νικόλαος, Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, τέθηκε υπό μελέτη το ζήτημα της αξιοποίησης απόβλητων φρούτων από τις λαϊκές αγορές, με απώτερο στόχο τόσο τη δημιουργία βιοδιυλιστηρίου και την παραλαβή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, λόγου χάρη τα αντιοξειδωτικά συστατικά, οι πηκτίνες και το λιμονένιο, όσο και την παραγωγή φυσικών χρωστικών ουσιών μέσω μικροβιακής ζύμωσης, σε υγρές καλλιέργειες (Submerged Fermentations), καθώς και σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης (Solid State Fermentations). Η μελέτη της σύστασης των φρούτων αποτέλεσε πρωταρχικό και καθοριστικό βήμα στην έναρξη της έρευνας, καθώς βάσει αυτής αξιολογήθηκε η καλύτερη μέθοδος αξιοποίηση των αποβλήτων. Εν συνέχεια, μελετήθηκε ο βέλτιστος τρόπος της δημιουργίας του βιοδιυλιστηρίου, όντας ως στόχος η άρτια και επιτυχής παραλαβή των αντιοξειδωτικών συστατικών και από τα δύο απόβλητα φρούτα, καθώς ακόμα και η παραλαβή των πηκτινών και του αιθέριου ελαίου από το μήλο και το φλοιό πορτοκαλιού, αντίστοιχα. Ο διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών από το υπόλοιπο μέρος του μήλου πραγματοποιήθηκε τόσο με τη χρήση υδατόλουτρο υπερήχων, όσο και με τη χρήση επωαστήρα υπό ανάδευση, καθώς και με τη χρήση διαφόρων διαλυτών (EtOH, EtOH/HCl, MeOH και MeOH/HCl). Στόχος των δοκιμών αυτών ήταν η διαπίστωση των βέλτιστων συνθηκών παραλαβής των αντιοξειδωτικών συστατικών. Αντίθετα, για το φλοιό πορτοκαλιού, επιλέχθηκε αποκλειστικά η χρήση του υδατόλουτρου υπερήχων και του συνδυασμού διαλυτών EtOH/HCl. Όσον αφορά στις πηκτίνες, αυτές παρελήφθησαν από το μήλο μέσω όξινης υδρόλυσής τους, με τη χρήση αντιδραστηρίων, ενώ τέλος η μέθοδος της απόσταξης επιλέχθηκε για την παραλαβή του λιμονένιου από το φλοιό του πορτοκαλιού. Παράλληλα με την εξέλιξη του βιοδιυλιστηρίου, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε συνθετικό υπόστρωμα με στελέχη του μύκητα *Penicillium purpurogenum*. Τα εμπορικά υποστρώματα του Czapek Broth, του TSB Broth και του YMB χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και την παραγωγή εξωκυτταρικής χρωστικής. Ακολούθησαν υγρές καλλιέργειες με υπόστρωμα αποτελούμενο από διάλυμα αλάτων και σάκχαρα της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης, συγκέντρωσης 30 g/L το καθένα, καθώς και ζυμώσεις οι οποίες πέρα από τα παραπάνω περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος-κιτρικού νατρίου (7,66 και 18,6 g/L, αντίστοιχα) και διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης (50

g/L). Οι υγρές καλλιέργειες με εμπορικά υποστρώματα ολοκληρώθηκαν με ζυμώσεις στις οποίες επιλέχθηκαν διάφορες αναλογίες C/N. Με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη και τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 30, 50 και 70 g/L και με μεταβλητή πηγή αζώτου το διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης, η ανάπτυξη του μύκητα πραγματοποιήθηκε στις αναλογίες 5:1, 10:1, 20:1, 40:1, 60:1 και 80:1. Κατά τη διάρκεια των παραπάνω πειραμάτων, αξιολογήθηκε η παραγωγή ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών χρωστικών, η εκχύλιση αυτών και η κατανάλωση των σακχάρων, του ανόργανου φωσφόρου και του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων. Στην αναλογία C/N 20:1 η μέγιστη απορρόφηση της κόκκινης χρωστικής ήταν στα 0,11 AU/mL, ενώ σε αυτή την αναλογία πραγματοποιήθηκαν οι υγρές καλλιέργειες, στις οποίες ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν τα φυσικά σάκχαρα από το μήλο. Από την άλλη, οι φλοιοί πορτοκαλιού αποτέλεσαν την πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη του μύκητα στις ζυμώσεις στερεάς κατάστασης, στις οποίες η υγρασία του υποστρώματος ήταν στο 65 %.

Λέξεις-Κλειδιά: Βιοδιυλιστήριο, προϊόντα προστιθέμενης αξίας, απόβλητα μήλου, απόβλητα φλοιού πορτοκαλιού, ζυμώσεις, χρωστικές, *Penicillium purpurogenum*

ABSTRACT

The issue of the utilization of fruit waste from the public markets was studied, with the ultimate goal of creating both a biorefinery and the receipt of added value products such as antioxidant components, pectins and limonene, as well as its exploitation residual fraction for the production of natural pigments through microbial fermentations, using the fungus *Penicillium purpurogenum*. Fruits were valorized through biorefinery development in order to extract value added products, like antioxidant compounds, pectins from apples and the essential oils from orange peel. The separation of phenolic compounds from apple waste was carried out using an ultrasonic water bath and a shaker incubator as well as various solvents (EtOH, EtOH/HCl, MeOH and MeOH / HCl). The aim of these experiments was to optimize antioxidant extraction. Pectin extraction from apples was achieved using acid hydrolysis. D-limonene was extracted from orange peels through distillation. The remaining sugars or complex polysaccharides were then evaluated for microbial pigment production. Fermentations were performed on synthetic substrate with strains of *Penicillium purpurogenum.* The commercial substrates of Czapek Broth, TSB Broth and YMB were used for the production of the extracellular and intracellular pigment. Submerged fermentations were carried out in a synthetic substrate with commercial sugars (sucrose, glucose and fructose). Subsequently, fermentations were carried out using a solution of salts was used as a buffer. Submerged fermentations with commercial substrates were also carried out at various C/N ratios, at carbon concentrations of 30, 50 and 70 g/L with a variable nitrogen source of yeast extract solution, resulting in C/N ratios of 5:1, 10:1, 20:1, 40:1, 60:1 and 80:1. During the experiments, the production of intercellular and extracellular pigment and the consumption of sugars, inorganic phosphorus and free amino nitrogen were evaluated, while phenolic components and antioxidant capacity were determined. The natural sugars of the apple were used in submerged fermentations in which the C/N ratio was 20:1. On the other hand, orange peels were used for solid state fermentation at initial moisture content of 65 %.

Keywords: Biorefinery, value-added products, apple waste, orange peel waste, fermentations, pigments, *Penicillium purpurogenum*

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής ερευνητικής μου μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επίκουρο καθηγητή κ. Κουτίνα Απόστολο. Τόσο με την εμπιστοσύνη με την οποία με ενέπνευσε, όσο και με την εμπιστοσύνη την οποία έδειξε στο άτομό μου, με ενέταξε με μεγάλη προθυμία στο Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, δίνοντάς μου την ευκαιρία να μελετήσω ένα θέμα ιδιαίτερα καινούριο, ενδιαφέρον, αλλά και καινοτόμο, για τους δικούς μου γνωστικούς ορίζοντες.

Επιπλέον, ευχαριστώ όλη την ομάδα από Εργαστήρια Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για την αμέριστη αρωγή τους στη περάτωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, συμβάλλοντας ο καθένας με το δικό του τρόπο. Συγκεκριμένα, απευθύνω ιδιαιτέρως τις ευχαριστίες μου στους: Λαδάκη Δημήτρη, Παπαδάκη Κατερίνα, Παπαποστόλου Χαρίλαο και Πατεράκη Χρυσάνθη.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ δεν δύναται να παραλειφθεί στους: Κατερίνα, Έφη, Αντώνη, Κατερίνα, Νάντια, Γιώργο, Βασίλη, Ευτύχη και Ηλία.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 4

ABSTRACT 6

Ευχαριστίες 7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ 23

1.1 Το ζήτημα των αποβλήτων 23

1.2 Η έννοια του βιοδιυλιστηρίου 24

1.3 Το μήλο και το πορτοκάλι ως βιομηχανικά απόβλητα 24

1.4 Η χημική σύσταση του μήλου και του φλοιού πορτοκαλιού 26

1.5 Συνηθισμένες και εναλλακτικές μέθοδοι αξιοποίησης των απόβλητων φρούτων 30

1.6 Οι φυσικές και συνθετικές χρωστικές ουσίες στα τρόφιμα 31

1.7 Οι φυσικές χρωστικές από τη σκοπιά της Βιοτεχνολογίας 33

1.8 Οι πολυκετιδικές δομές από μύκητες ως χρωστικές ουσίες τροφίμων 35

1.9 Η περίπτωση της παραγόμενης τοξίνης, κιτρινίνη 37

1.10 Οι φυσικές χρωστικές με τη χρήση του μύκητα *Penicillium purpurogenum* 38

1.11 Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής 40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ 42

2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός και υλικές υποδομές 42

2.2 Μήλο – Πορτοκάλι 42

2.2.1 Πρώτη ύλη 42

2.2.2 Μελέτη σύστασης του μήλου και του πορτοκαλιού 42

2.2.3 Εκχύλιση των ελεύθερων σακχάρων με νερό, από το μήλο 50

2.2.4 Εκχύλιση των αντιοξειδωτικών συστατικών από τα, υπό μελέτη, φρούτα 50

2.2.5 Διαχωρισμός πηκτινών από το μήλο 52

2.2.6 Απόσταξη D-λιμονένιου από τις φλούδες πορτοκάλι 54

2.3 Ζυμώσεις 57

2.3.1 Υγρές καλλιέργειες (Submerged fermentations, SmF) 57

2.3.1.1 Εμπορικά υποστρώματα-Czapek-dox broth, TSB broth, YMB 57

2.3.1.2 Εμπορικά σάκχαρα – σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη και διάλυμα αλάτων 61

2.3.1.3 Εμπορικά σάκχαρα – σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract solution) και ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) 64

2.3.1.4 Διάφορες αναλογίες στην πηγή άνθρακα και αζώτου (C/N) 65

2.3.1.5 Φυσικά σάκχαρα του μήλου, στην αναλογία C/N 20:1 69

2.3.2 Ζυμώσεις στερεάς κατάστασης (Solid State Fermentations, SSF) 70

2.3.2.1 Με φυσικά σάκχαρα του πορτοκαλιού 70

2.4 Αναλυτικές μέθοδοι 71

2.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (Inorganic phosphorus-IP) 71

2.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός αζώτου των ελευθέρων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen-FAN) 73

2.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ελεύθερων σακχάρων μέσω HPLC 74

2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών μέσω Folin-Ciocalteau (Total Phenolic Content) 75

2.4.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH Radical Scavenging Method) 76

2.4.6 Ποσοτικός προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων 76

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 79

3.1 Αποτελέσματα σύστασης των, υπό μελέτη, φρούτων 79

3.1.1 Μήλο 79

3.1.2 Φλούδες πορτοκαλιού 82

3.2 Αποτελέσματα βιοδιυλιστηρίου των, υπό μελέτη, φρούτων 85

3.2.1 Βιοδιυλιστήριο μήλου – Βελτιστοποίηση συνθηκών 85

3.2.2 Ισοζύγια μάζας μήλου 90

3.2.2.1 Εκχύλιση σακχάρων με H_2O, αραίωση 1:10 w/v 90

3.2.2.2 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών με EtOH – HCl, αραίωση 1:20 w/v . 90

3.2.2.3 Εκχύλιση πηκτινών 91

3.2.3 Βιοδιυλιστήριο φλούδας πορτοκαλιού – Βελτιστοποίηση συνθηκών..... 91

3.2.4 Ισοζύγια μάζας φλούδας πορτοκαλιού 92

3.2.4.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών με EtOH – HCl, αραίωση 1:25 w/v . 92

3.2.4.2 Εκχύλιση D – λιμονένιου, με υδροατμοαπόσταξη 93

3.2.5 Αξιοποίηση αποβλήτων φρούτων για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας μέσω της ανάπτυξης βιοδιυλιστηρίου 93

3.3 Αποτελέσματα ζυμώσεων 99

3.3.1 Υγρές καλλιέργειες 99

3.3.1.1 Εμπορικά υποστρώματα CZAPEK broth, TSB και YMB 99

3.3.1.2 Εμπορικά σάκχαρα – σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη και διάλυμα αλάτων 103

3.3.1.3 Εμπορικά σάκχαρα – σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract solution) και ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) 112

3.3.1.3 Διάφορες αναλογίες C/N, με εμπορικά σάκχαρα, ως πηγή άνθρακα και εκχύλισμα ζύμης, ως πηγή αζώτου 123

3.3.1.4 Φυσικά σάκχαρα του μήλου, στην αναλογία C/N 20:1 149

3.3.2 Στερεές καλλιέργειες 150

3.3.2.1 Φλούδες πορτοκαλιού 150

3.3.3 Παραγωγή βιογενών χρωστικών μέσω μικροβιακών ζυμώσεων 150

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 154

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 155

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1. 1 Χημική σύσταση μήλου 26
Εικόνα 1. 2 Χημική σύσταση φλοιού πορτοκαλιού 27
Εικόνα 1. 3 D-λιμονένιο 28
Εικόνα 1. 4 Χλωρογενικό οξύ 29
Εικόνα 1. 5 Εσπεριδίνη 30
Εικόνα 1. 6 Βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης πολυκετιδικών δομών 36
Εικόνα 1. 7 Κιτρινίνη 37
Εικόνα 1. 8 Ανκαφλαβίνη (κίτρινο) 38
Εικόνα 1. 9 Μονασκίνη (κίτρινο) 39
Εικόνα 1. 10 Μονασκουβρίνη (κίτρινο) 39
Εικόνα 1. 11 Μονασκορουβραμίνη (κόκκινο-μωβ) 39
Εικόνα 1. 12 2-καρβόξυλο-μονασκορουβραμίνη (κόκκινο-μωβ) 40

Εικόνα 2. 1 Ξηρό δείγμα μήλου, μετά τη λυοφιλίωση 43
Εικόνα 2. 2 Ξηρό δείγμα φλούδας πορτοκαλιού, μετά τη λυοφιλίωση 43
Εικόνα 2. 3 Συσκευή πέψης για την ανάλυση της Kjeldhal 45
Εικόνα 2. 4 Συσκευή απόσταξης για την ανάλυση της Kjeldhal 45
Εικόνα 2. 5 Εκχύλιση λίπους κατά Soxhlet, στο μήλο 46
Εικόνα 2. 6 Εκχύλισης λίπους κατά Soxhlet, στις φλούδες πορτοκάλι 47
Εικόνα 2.7 Στερεό υπόλειμμα, μετά την εξάτμιση του διαλύτη EtOH-HCl, κατά την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών στο μήλο 52
Εικόνα 2.8 Στερεό υπόλειμμα, μετά την εξάτμιση του διαλύτη EtOH-HCl, κατά την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών στις φλούδες πορτοκαλιού 52
Εικόνα 2.9 Πηκτίνες, μετά τις εκπλύσεις με EtOH (70 και 97%) 53
Εικόνα 2.10 Πηκτίνες, μετά την ξήρανσή τους, υπό κατάψυξη 53
Εικόνα 2.11 Διαχωρισμός της φλούδας πορτοκαλιού στο λευκό και το πορτοκαλί τμήμα 55
Εικόνα 2. 12 Διάταξη απόσταξης D – λιμονένιου 56
Εικόνα 2. 13 D-Λιμονένιο 57
Εικόνα 2.14 Στερεή προκαλλιέργεια Czapek broth, με ανεπτυγμένο τον μύκητα Penicillium purpurogenum 58

Εικόνα 2. 15 Εναιώρημα του μύκητα Penicillium purpurogenum, μετά την προσθήκη του διαλύματος Tween 80.....58
Εικόνα 2. 16 Πλάκα αιματοκυτταρόμετρου Thoma.....59
Εικόνα 2. 17 Δεκαεξάδα τετραγώνων, της πλάκας αιματοκυτταρόμετρου Thoma....60
Εικόνα 2.18 Εμβολιασμός μύκητα στις υγρές καλλιέργειες των εμπορικών υποστρωμάτων, Czapek broth, TSB, YMB, μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής (Telstar Bio II Advance, Biological safety cabinet, Laminar flow).....60
Εικόνα 2.19 Υγρές καλλιέργειες με τα εμπορικά υποστρώματα Czapek broth, TSB και YMB.....61
Εικόνα 2. 20 Microplate για μέτρηση απορρόφησης της χρωστικής, στα 400, 470 και 500 nm.....61
Εικόνα 2. 21 Διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, για την εκχύλιση της ενδοκυτταρικής χρωστικής.....63
Εικόνα 2. 22 Παραχθείσα εξωκυτταρική χρωστική, στις διάφορες αναλογίες C/N, με τη σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα.....68
Εικόνα 2. 23 Παραχθείσα εξωκυτταρική χρωστική, στις διάφορες αναλογίες C/N, με τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.....68
Εικόνα 2.24 Παραχθείσα βιομάζα, στην αναλογία C/N 80:1, με τη σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα.....68
Εικόνα 2.25 Υγρές καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τα φυσικά σάκχαρα του μήλου, στην αναλογία C/N 20:1.....70
Εικόνα 2.26 Στερεές καλλιέργειες, με υπόστρωμα τις φλούδες πορτοκαλιού. Αριστερά σε χρόνο t=0 και δεξιά μετά την παρέλευση 2 εβδομάδων, από τον εμβολιασμό.....71
Εικόνα 2.27 Πρότυπα δείγματα K_2HPO_4, για τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου (IP), με συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/L (από αριστερά προς τα δεξιά).....72
Εικόνα 2.28 Μηχανισμός δράσης του DPPH.....76

Εικόνα 3. 1 Διαγραμματική απεικόνιση ισοζυγίου μάζας στο μήλο, με 100 g αρχικό ξηρό βάρος.....97
Εικόνα 3. 2 Διαγραμματική απεικόνιση ισοζυγίου μάζας στις φλούδες πορτοκαλιού, με 100 g αρχικό ξηρό βάρος.....99
Εικόνα 3. 3 Κιτρικό οξύ (Sigma-Aldrich).....118

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1.1 Παραδείγματα χρωστικών τροφίμων (φυσικών και συνθετικών).....32

Πίνακας 2.1 Συγκεντρώσεις διαλύματος εκχυλίσματος ζύμης και διαλύματος σακχαρόζης, για τις διάφορες αναλογίες C/N.....67
Πίνακας 2.2 Συγκεντρώσεις διαλύματος εκχυλίσματος ζύμης και διαλύματος γλυκόζης, για τις διάφορες αναλογίες C/N.....67

Πίνακας 3. 1 Αποτελέσματα σύστασης του μήλου.....80
Πίνακας 3.2 Αποτελέσματα υδατοδιαλυτών (IP, FAN σε mg/100 g ξηρού βάρους και σάκχαρα και μηλικό οξύ σε g/100 g ξηρού βάρους) και οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων, στις εκχυλίσεις κατά Soxhlet, στο μήλο.....81
Πίνακας 3. 3 Αποτελέσματα σύστασης της φλούδας πορτοκαλιού.....83
Πίνακας 3. 4 Αποτελέσματα υδατοδιαλυτών και οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων, στις εκχυλίσεις κατά Soxhlet, στις φλούδες πορτοκαλιού 84
Πίνακας 3.5 Αποτελέσματα σύστασης της φλούδας πορτοκαλιού, σε λιγνίνη, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη 85
Πίνακας 3.6 Συγκεντρώσεις εκχυλιζόμενων σακχάρων (g/L), όπως προέκυψαν από την ανάλυση της HPLC, κατά την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών μέσω επωαστήρα υπό ανάδευση 86
Πίνακας 3.7 Συγκεντρώσεις σακχάρων (g/100 g ξηρού βάρους), κατά την έκπλυση του πολτού με νερό, στις διάφορες αναλογίες.....87
Πίνακας 3.8 Συγκεντρώσεις εκχυλιζόμενων φαινολικών συστατικών (mg/100 g ξηρού βάρους), με τη χρήση επωαστήρα υπό ανάδευση.....88
Πίνακας 3.9 Συγκεντρώσεις εκχυλιζόμενων φαινολικών συστατικών (mg/100 g ξηρού βάρους), με τη χρήση υδατόλουτρου υπερήχων.....89
Πίνακας 3.10 Συγκεντρώσεις σακχάρων και μηλικού οξέος σε g/L, 100 g/19,24 g ξηρού βάρους και ποσοστό (%) επί ξηρού, μετά την εκχύλιση των σακχάρων 1:10 w/v με H_2O.....90
Πίνακας 3.11 Συγκεντρώσεις των μεθανολικών εκχυλισμάτων σε φαινολικά συστατικά, εκφρασμένα σε mg/L, mg/0,02 L MeOH και mg/g στερεού υπολείμματος 91

Πίνακας 3.12 Συγκεντρώσεις των μεθανολικών εκχυλισμάτων σε φαινολικά συστατικά, εκφρασμένα σε mg/L, mg/0,02 L MeOH και mg/g στερεού υπολείμματος 92
Πίνακας 3.13 Αποτελέσματα ισοζυγίου μάζας στο μήλο, εκφρασμένα σε g/19,24 g ξηρού βάρους και g/100 g ξηρού βάρους.....96
Πίνακας 3. 14 Αποτελέσματα ισοζυγίου μάζας στις φλούδες πορτοκάλι, εκφρασμένα σε g/33,20 g ξηρού βάρους και g/100 g ξηρού βάρους.....98
Πίνακας 3.15 Παραγωγικότητα ζύμωσης για τα εμπορικά υποστρώματα Czapek, TSB και YMB, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=12 ημέρες....103
Πίνακας 3.16 Απόδοση ζύμωσης για το εμπορικό υπόστρωμα Czapek, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=12 ημέρες 103
Πίνακας 3.17 Παραγωγικότητα ζύμωσης για την σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=11 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων 108
Πίνακας 3.18 Απόδοση ζύμωσης για την σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=11 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων.....108
Πίνακας 3.19 Παραγωγικότητα ζύμωσης για την σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=13 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα.....117
Πίνακας 3.20 Απόδοση ζύμωσης για την σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=13 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα 117
Πίνακας 3.21 Βαθμοί εκχύλισης της εξωκυτταρικής χρωστικής από την υγρή καλλιέργεια με πηγή C την σακχαρόζη, με τη χρήση διαφόρων αναλογιών οξικού αιθυλεστέρα και 2-προπανόλης 119
Πίνακας 3.22 Παραγωγικότητα ζύμωσης για την σακχαρόζη και τη γλυκόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t= 7 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N 142
Πίνακας 3.23 Απόδοση ζύμωσης για την σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t= 7 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N 143

Πίνακας 3.24 Συγκεντρώσεις της σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης, καθώς και το σύνολο αυτών στην υγρή καλλιέργεια με τα φυσικά σάκχαρα του μήλου, στην αναλογία C/N 20:1 150

Περιεχόμενα γραφημάτων

Γράφημα 2.1 Πρότυπη καμπύλη K_2HPO_4, για τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου (IP) 72
Γράφημα 2.2 Πρότυπη καμπύλη γλυκίνης, για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινοξέων (FAN) 74
Γράφημα 2.3 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος, για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Folin - Ciocalteau) 75
Γράφημα 2.4 Πρότυπη καμπύλη της γλυκόζης, για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων, μέσω της μεθόδου DNS 77
Γράφημα 2.5 Πρότυπη καμπύλη της φρουκτόζης, για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων, μέσω της μεθόδου DNS 78

Γράφημα 3.1 Σύγκριση απορροφήσεων/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400 nm, για τα υποστρώματα του Czapek broth, TSB και YMB 100
Γράφημα 3.2 Σύγκριση απορροφήσεων/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 470 nm, για τα υποστρώματα του Czapek broth, TSB και YMB 101
Γράφημα 3.3 Σύγκριση απορροφήσεων/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 500 nm, για τα υποστρώματα του Czapek broth, TSB και YMB 101
Γράφημα 3.4 Απεικόνιση της κατανάλωσης του σακχάρου της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων /mL της παραγόμενης χρωστικής, στα 400, 470 και 500 nm, με υπόστρωμα το Czapek broth 102
Γράφημα 3.5 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP) (mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων 104
Γράφημα 3.6 Απεικόνιση της κατανάλωσης του σακχάρου της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων 104
Γράφημα 3.7 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP) (mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων 105
Γράφημα 3.8 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400,

470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων 106
Γράφημα 3.9 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της φρουκτόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP) (mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων 107
Γράφημα 3.10 Απεικόνιση της κατανάλωσης της φρουκτόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων 107
Γράφημα 3.11 Απεικόνιση απορροφήσεων/mL κατά τις εκχυλίσεις των χρωστικών από το υπερκείμενο των ζυμώσεων με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων 109
Γράφημα 3.12 Απορροφήσεις/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων 110
Γράφημα 3.13 Απορροφήσεις/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων 111
Γράφημα 3.14 Απορροφήσεις/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων 111
Γράφημα 3.15 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP) (mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα 113
Γράφημα 3.16 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα.....113
Γράφημα 3.17 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP) (mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα 114
Γράφημα 3.18 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400,

470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα.....115
Γράφημα 3.19 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της φρουκτόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα 116
Γράφημα 3.20 Απεικόνιση της κατανάλωσης της φρουκτόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα.....116
Γράφημα 3.21 Συγκριτική απεικόνιση των απορροφήσεων/mL των εκχυλιζόμενων εξωκυτταρικών χρωστικών, στα 400, 470 και 500 nm, για τις διάφορες αναλογίες οξικού αιθυλεστέρα και 2-προπανόλης, στις υγρές καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη.....120
Γράφημα 3.22 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων εξωκυτταρικών χρωστικών, στα 400, 470 και 500 nm, στην αναλογία 1:9 οξικού αιθυλεστέρα και 2 - προπανόλης, στις υγρές καλλιέργειες με διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα.....121
Γράφημα 3.23 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων / mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα.....122
Γράφημα 3.24 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων / mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα.....122
Γράφημα 3.25 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων / mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα.....123
Γράφημα 3.26 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 5:1 124

Γράφημα 3.27 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 5:1 124
Γράφημα 3.28 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 10:1 125
Γράφημα 3.29 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 10:1 126
Γράφημα 3.30 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 20:1 127
Γράφημα 3.31 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 20:1 127
Γράφημα 3.32 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 40:1 128
Γράφημα 3.33 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 40:1 129
Γράφημα 3.34 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 60:1 130
Γράφημα 3.35 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 60:1 130
Γράφημα 3.36 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου

ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 80:1 131
Γράφημα 3.37 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 80:1 132
Γράφημα 3.38 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 5:1 133
Γράφημα 3.39 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 5:1.....133
Γράφημα 3.40 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 10:1 134
Γράφημα 3.41 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 10:1.....135
Γράφημα 3.42 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 20:1 136
Γράφημα 3.43 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 20:1.....136
Γράφημα 3.44 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 40:1 137
Γράφημα 3.45 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 40:1.....138

Γράφημα 3.46 Απεικόνιση της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 60:1 139
Γράφημα 3.47 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 60:1 139
Γράφημα 3.48 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 80:1 140
Γράφημα 3.49 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές με αναλογία C/N 80:1.....141
Γράφημα 3.50 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων εξωκυτταρικών χρωστικών, στα 400, 470 και 500 nm, στην αναλογία 1:9 οξικού αιθυλεστέρα και 2-προπανόλης, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N και πηγή άθρακα τη σακχαρόζη.....144
Γράφημα 3.51 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων εξωκυτταρικών χρωστικών, στα 400, 470 και 500 nm, στην αναλογία 1:9 οξικού αιθυλεστέρα και 2 - προπανόλης, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N και πηγή άθρακα τη γλυκόζη.....145
Γράφημα 3.52 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων / mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, στα 400 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N.....146
Γράφημα 3.53 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, στα 470 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N.....146
Γράφημα 3.54 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, στα 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N.....147

Γράφημα 3.55 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη στα 400 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N 147
Γράφημα 3.56 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη στα 470 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N 148
Γράφημα 3.57 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη στα 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N 149

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το ζήτημα των αποβλήτων

Ένα από τα μείζονα ζητήματα που η δυτική κοινωνία αντιμετωπίζει τα τελευταία χρόνια, είναι αυτό του μεγάλου όγκου, της παραγωγής των αποβλήτων από τις διάφορες βιομηχανικές εγκαταστάσεις. Το 39 % αυτών προέρχεται από τις βιομηχανίες τροφίμων, ενώ το 42 % αποτελεί τα οικιακά απόβλητα. Το οξύμωρο του ζητήματος αυτού είναι πως από τη μία το 15 % του πληθυσμού στις αναπτυσσόμενες χώρες βρίσκεται κάτω από τα όρια της φτώχειας, μην μπορώντας να καλύψει τις βασικές διατροφικές ανάγκες, ενώ από την άλλη, χώρες του δυτικού κόσμου έχουν έρθει αντιμέτωπες με το θέμα της υπερκατανάλωσης τροφίμων, καθώς και με την αύξηση του όγκου των αποβλήτων που προέρχονται από αυτά. (Mirabella et al., 2014)

Οι βιομηχανίες τροφίμων παράγουν μεγάλες ποσότητες απόβλητων φρούτων και λαχανικών. Αναφορικά, στις βιομηχανίες επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών το ποσοστό των απόβλητων ή και των παραπροϊόντων ανέρχεται στο 30-50 %, ενώ μόνο για την Ευρωπαϊκή Επικράτεια ο παραγόμενος όγκος αποβλήτων από τις προαναφερθείσες βιομηχανίες αγγίζει τους 30 εκατομμύρια τόνους, ετησίως. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτά είτε χρησιμοποιούνται ως λίπασμα, είτε ως ζωοτροφές, ενώ δεν αποκλείεται και η καύση αυτών προς απελευθέρωση ενέργειας. Αντί των παραπάνω, μια δυνητική λύση του προβλήματος των αποβλήτων ανά τον κόσμο, θα ήταν η αξιοποίησή τους από τομείς της κοσμητολογίας, της φαρμακευτικής, αλλά και από τον κλάδο των τροφίμων, λόγω των βιοδραστικών ουσιών, που τα απόβλητα αυτά περιέχουν. Με άλλα λόγια, καθώς οι φυσικοί πόροι ολοένα και παρουσιάζουν καθοδική πορεία, η εκμετάλλευση άλλων πρώτων, βιοαποικοδομημένων, υλών, αποτελεί πρακτική υψίστης σημασίας για το μέλλον του πλανήτη, ενώ οι παγκόσμιες οικονομίες χαρακτηρίζουν τα απόβλητα ως μια βιολογική πηγή ενέργειας για τις επόμενες γενιές. (Demiray et al., 2011, Matharu et al., 2016)

1.2 Η έννοια του βιοδιυλιστηρίου

Η εκμετάλλευση, από τα διάφορα επιστημονικά πεδία, των απόβλητων μιας βιομηχανίας εισάγει τον όρο του Βιοδιυλιστηρίου, καθώς ακόμα και την έννοια της αξιοποίησης προϊόντων προστιθέμενης αξίας, τα οποία προέρχονται από αυτά. Η έννοια της λέξης βιοδιυλιστήριο είναι συγκρίσιμη με εκείνη της λέξης διυλιστήριο. Ειδικότερα, όπως στο διυλιστήριο του πετρελαίου, το αργό πετρέλαιο διυλίζεται σε πιο χρήσιμα προϊόντα, όπως είναι η βενζίνη, η κηροζίνη και το υγραέριο, έτσι και στο βιοδιυλιστήριο, η βιομάζα των αποβλήτων βιοδιυλίζεται, μέσω διαφόρων τεχνικών, παρέχοντας προϊόντα προστιθέμενης αξίας, όπως είναι τα αντιοξειδωτικά συστατικά, τα αιθέρια έλαια, οι πηκτίνες, ενώ παράλληλα οι όροι της Πράσινης Χημείας και Τεχνολογίας όλο και περισσότερο και ενισχύονται. (Matharu et al., 2016)

1.3 Το μήλο και το πορτοκάλι ως βιομηχανικά απόβλητα

Για το έτος 2014, η πρωτογενής παραγωγή των φρούτων άγγιξε τους 35 εκατομμύρια τόνους παγκοσμίως, ενώ για το ίδιο έτος στην Ευρώπη η παραγωγή έφτασε του 512.000 τόνους. Για την Ευρωπαϊκή Επικράτεια, το 20 % των απόβλητων φρούτων προέρχεται κατά την παραγωγή τους, ενώ 5 % είναι τα προκύπτοντα απόβλητα μετά τη συγκομιδή και την αποθήκευση των φρούτων. Κατά τη διανομή των νωπών φρούτων το 10 % καταλήγει ως απόβλητο, ενώ και ο καταναλωτής φέρει ευθύνη για την αύξηση του όγκου των αποβλήτων, κατέχοντας το ποσοστό του 19 %. Τέλος, σημαντικές ποσότητες απορριφθέντων φρούτων προκύπτουν και από τις λαϊκές αγορές, δημιουργώντας ακόμα περισσότερες αρνητικές επιπτώσεις και καθιστώντας έτσι αναγκαία την ανάπτυξη ενός βιοδιυλιστηρίου για την αξιοποίηση των αποβλήτων αυτών και την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. (Liakou et al., 2018)

Τα μήλα αποτελούν ένα από τα πιο γνωστά φρούτα ανά τον κόσμο καταλαμβάνοντας, ανάμεσα στις διάφορες καλλιέργειες φρούτων, την 4^{η} θέση σε παγκόσμιο επίπεδο, με την παραγωγή τους ανέρχεται στους 58 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Για τα έτη 2008-2009, η παγκόσμια παραγωγή μήλων ξεπέρασε τους 69 εκατομμύρια τόνους, με τους 455.361 τόνους να προέρχονται από τον Καναδά. Από την καλλιέργεια των μήλων, το 70-75 % διατίθεται στο εμπόριο, με σκοπό τη νωπή

κατανάλωσή τους και το υπόλοιπο 25-30 % χρησιμοποιείται από τις βιομηχανίες επεξεργασίας φρούτων. Με τη σειρά τους, οι μονάδες παραγωγής προϊόντων μήλου, αξιοποιούν κατά την εκχύμωση το 65 %, ενώ το 35 % αποτελούν άλλα προκύπτοντα, από το φρούτο, προϊόντα (ζελέ, μηλίτης). Μετά το πέρας της διαδικασίας της χυμοποίησης, το 25-30 % είναι το ακατέργαστο απόβλητο μήλου, το οποίο προκύπτει. Η άμεση διάθεση των αγροτοβιομηχανικών υποπροϊόντων μήλου στο περιβάλλον έχει αρνητικό αντίκτυπο σε αυτό, καθώς αυξάνονται οι πιθανότητες ρύπανσής του. Παράλληλα, τα απόβλητα αυτά αποτελούν μια σημαντική απώλεια βιομάζας που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων υψηλής αξίας. (Dhillon et al., 2013) Σήμερα, ο τομέας της βιοτεχνολογίας δύναται να χρησιμοποιήσει τα απόβλητα αυτά είτε ως υπόστρωμα ανάπτυξης διαφόρων μικροοργανισμών, είτε ως εναλλακτική πηγή καυσίμων και ενέργειας, είτε ως πηγή φυτικών ινών, πηκτινών και φαινολικών συστατικών. (Mirabella et al., 2014)

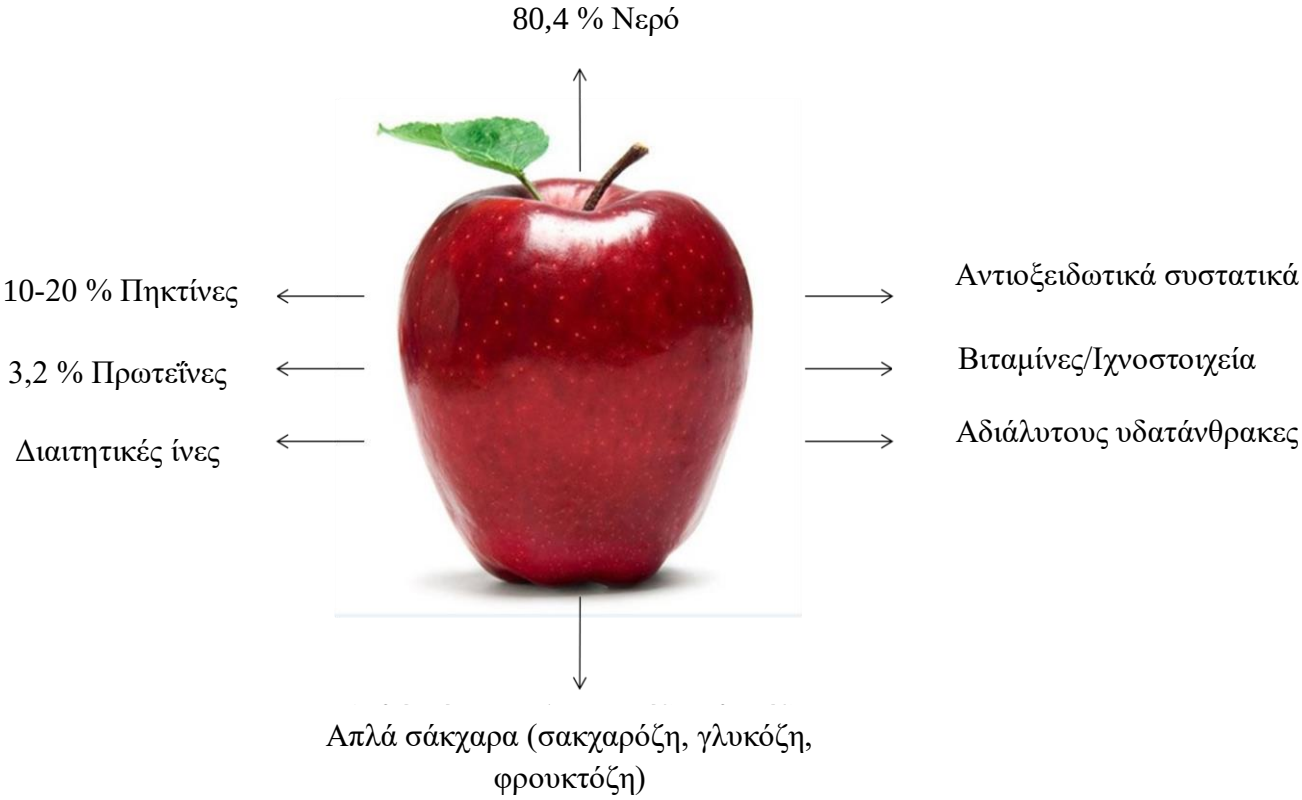
Ένα επιπλέον πρόβλημα της βιομηχανίας των φρούτων, το οποίο προκύπτει σε μεγάλες ποσότητες, είναι τα υπολείμματα της αξιοποίησης των πορτοκαλιών, η κατανάλωση του οποίου γίνεται είτε στη νωπή του μορφή, είτε χρησιμοποιείται για εκχύμωση. Το 61 % της παγκόσμιας παραγωγής εσπεριδοειδών προέρχεται από τις χώρες της Βραζιλίας, των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής, της Ισπανίας και του Μεξικού, ενώ αναφέρεται πως το 2013, η παραγωγή σε εσπεριδοειδή έφτασε τους 71,5 εκατομμύρια τόνους. Αξίζει να σημειωθεί πως τα τελευταία 20 χρόνια, η παραγωγή πορτοκαλιών έχει αυξηθεί κατά 22 %, με ανοδική αυτή την πορεία να παρατηρείται και στα επόμενα έτη, ενώ εκτιμάται ότι χρησιμοποιείται άνω του 70 % για την παραγωγή χυμού ή και μαρμελάδας, σε παγκόσμια κλίμακα. (Matharu et al., 2016) Από αυτή την παραγωγή, περίπου το 50-60 % του νωπού βάρους του πορτοκαλιού είναι απόβλητο, αποτελούμενο από το φλοιό και τα υπολείμματα του καρπού.(Wilkins et al., 2007)

Συνεπώς, δεδομένου αυτού του μεγάλου όγκου απόβλητων φρούτων που προκύπτουν από τις μονάδες επεξεργασίας φρούτων, δημιουργείται η ανάγκη εφαρμογής εναλλακτικών μεθόδων αξιοποίησης των παραπροϊόντων αυτών με απώτερο σκοπό την αποφυγή προβλημάτων περιβαλλοντικής φύσεως, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης των αποβλήτων. Το αιθέριο έλαιο του D-λιμονένιου στο φλοιό πορτοκαλιού, οι πηκτίνες, οι διαιτητικές ίνες, τα διαλυτά στερεά, το κιτρικό οξύ, τα αντιοξειδωτικά συστατικά (φαινολικά και φλαβονοειδή) και τα απλά σάκχαρα

αποτελούν συστατικά αξιοποιήσιμα από όλες τις βιομηχανίες, ανά τον κόσμο, ενώ οι μέθοδοι με τις οποίες τα συστατικά αυτά διαχωρίζονται από το μήλο και το φλοιό του πορτοκαλιού είναι ποικίλες. (Matharu et al., 2016)

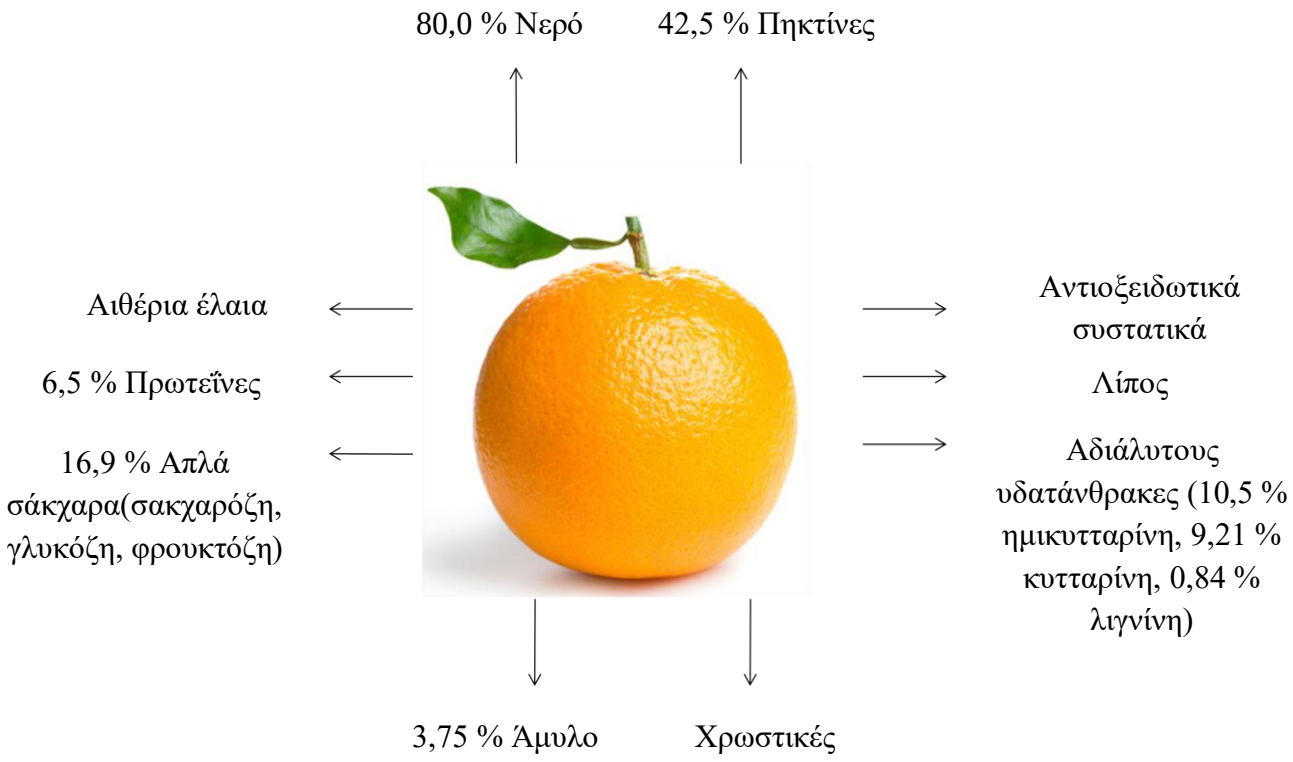
1.4 Η χημική σύσταση του μήλου και του φλοιού πορτοκαλιού

Γενικότερα, τα απόβλητα φρούτων απαρτίζονται από 75 % σάκχαρα και ημικυτταρίνη, 9 % κυτταρίνη και 5 % λιγνίνη. Ακόμα μέρος της σύστασής τους είναι οι πρωτεΐνες και το λίπος, ενώ 80-90 % είναι το ποσοστό του περιεχόμενου νερού. Το απόβλητο μήλο αποτελείται από υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (80,4 %), ξηρή ουσία (19,6 %) και απλά σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη), ενώ είναι πλούσιο σε πηκτίνες, πρωτεΐνες (3,2 %), διαιτητικές ίνες, αδιάλυτους υδατάνθρακες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη), βιταμίνες (7,8 mg/100 g νωπού βάρους) και ιχνοστοιχεία. (Campeanu et al., 2009, Mirabella et al., 2014)



Εικόνα 1. 1 Χημική σύσταση μήλου

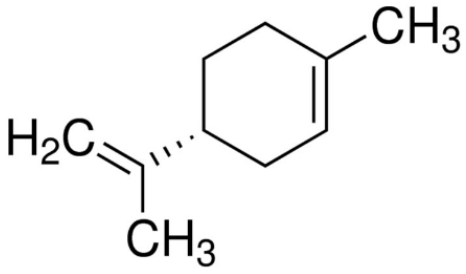
Από την άλλη μεριά, ο φλοιός του πορτοκαλιού αποτελείται από 80 % νερό και 20 % ξηρή ουσία. Τα κύρια συστατικά του φλοιού και των υπολειμμάτων σάρκας είναι τα διαλυτά σάκχαρα (16,9 %), οι πηκτίνες (42,5 %), τα λίπη (ελαϊκό, λινελαϊκό, λινολενικό, παλμιτικό, στεατικό και φυτοστερόλες), οι αδιάλυτοι υδατάνθρακες (κυτταρίνη-9,21 %, ημικυτταρίνη-10,5 % και λιγνίνη-0,84 %), οι πρωτεΐνες (6,5 %), το άμυλο (3,75 %), τα φλαβονοειδή (εσπεριδίνη), τα αιθέρια έλαια (D-λιμονένιο και οι χρωστικές ουσίες (καροτενοειδή και ξανθοφύλλες). (Ayala et al., 2017)



Εικόνα 1. 2 Χημική σύσταση φλοιού πορτοκαλιού

Το αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού είναι ένα μίγμα τερπενίων, που παράγεται από τα φυτά ως δευτερογενής μεταβολίτης. Έχουν βρεθεί ότι υπάρχουν συνολικά 18-22 ενώσεις, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί και αποτελούν το 98 % του αιθέριου ελαίου. Το μίγμα του αιθέριου ελαίου απαρτίζεται από μονοτερπένια, όπως είναι το λιμονένιο, το α-πινένιο και το β-μυρσένιο, από οξυγονωμένα μονοτερπένια, όπως είναι η ισοφορόνη, η δεκανάλη, το οξείδιο του λιμονένιου και η κιτρονελόλη, από σεσκιτερπένια, όπως είναι το βαλενκένιο και τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια, όπως είναι το 3-φουρανοξικό οξύ. (Kalinowska et al., 2014) Συγκεκριμένα, το λιμονένιο είναι ένας άχρωμος υγρός υδρογονάνθρακας σε θερμοκρασία δωματίου και εμφανίζεται σε δύο οπτικά ισομερή, το D- και το L-λιμονένιο. Το D-λιμονένιο

($C_{10}H_{16}$, Mr = 136,24 g/mol) αποτελεί το πιο σημαντικό μονοτερπένιο στο φλοιό του πορτοκαλιού και είναι ένα από τα εξαγόμενα από τον φλοιό, προϊόντα προστιθέμενης αξίας, καθώς η συγκέντρωσή του κυμαίνεται στο 90 % w/w. Το σημείο ζέσεως του βρίσκεται στους 176 ºC, είναι αδιάλυτο στο νερό, ενώ είναι αναμίξιμο με την αιθανόλη, το χλωροφόρμιο και τον τετραχλωράνθρακα. (Ayala et al., 2017)

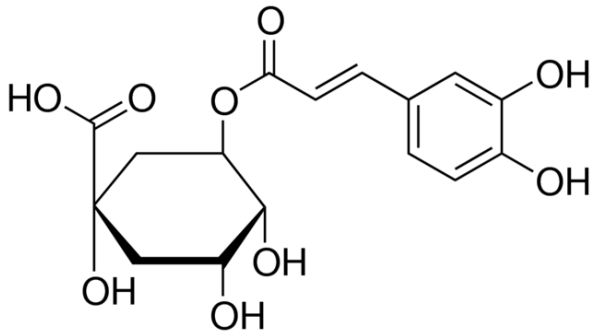


Εικόνα 1. 3 D-λιμονένιο (Sigma-Aldrich)

Όσον αφορά στις πηκτίνες, αυτές είναι ένα από τα κυριότερα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Γενικά, χαρακτηρίζονται ως ετεροπολυσακχαρίτες, που συνίστανται από πολυμερή του α-(1,4)-γαλακτουρονικού οξέος (GalA) και του μεθυλεστέρα του. Αποτελούν τα αδιάλυτα στο νερό πηκτινικά οξέα, ποικίλου βαθμού μεθυλιωμένα και κατά ένα ποσοστό εξουδετερωμένα, τα οποία είναι ικανά κάτω από κατάλληλες συνθήκες, να σχηματίζουν πηκτές με σάκχαρα, νερό και οξέα. Η ομογαλακτουρονάνη (HG) είναι ο κύριος τύπος πηκτίνης στο κυτταρικό τοίχωμα, αντιπροσωπεύοντας το 60 % της συνολικής πηκτίνης. Το πολυμερές της ομογαλακτουρονάνης αποτελείται από κατάλοιπα του α-(1,4)-γαλακτουρονικού οξέος, ενώ το ελάχιστο μήκος της αλυσίδας αυτής για τα μήλα και τα πορτοκάλια εκτιμάται ότι είναι 72-100 κατάλοιπα του GalA. Άλλοι τύποι που συνιστούν την πηκτίνη είναι η ξυλογαλακτουρονάνη, η ραμνογαλακτουρονάνη I και II, η αραβινάνη και η αραβινογαλακτάνη I και II. Το μεγαλύτερο μέρος της πηκτίνης που χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία τροφίμων προέρχεται από τα μήλα και τους φλοιούς των εσπεριδοειδών και από τα οποία παραλαμβάνεται με τη χρήση αντιδραστηρίων σε περιβάλλον με χαμηλό pH και υψηλή θερμοκρασία. (Voragen et al., 2009)

Το τελευταίο προϊόν προστιθέμενης αξίας, το οποίο θα αναλυθεί, είναι τα αντιοξειδωτικά συστατικά. Είναι γνωστό πως οι ελεύθερες ρίζες είναι υπεύθυνες για την οξειδωτική βλάβη που προκαλούν στον ανθρώπινο οργανισμό, με αποτέλεσμα

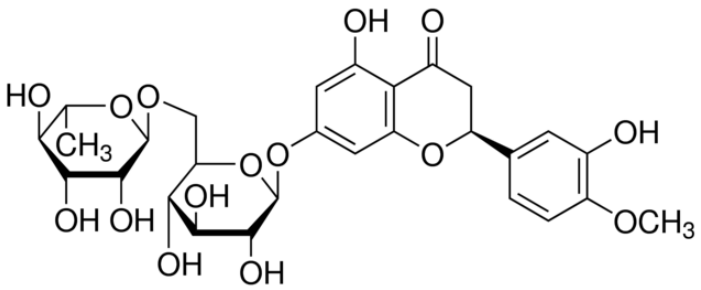
την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Ένα από τους τρόπους πρόληψης αυτών των ασθενειών είναι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν την ικανότητα της μείωσης του οξειδωτικού στρες. Τα μήλα κατέχουν τη δεύτερη θέση σε αντιοξειδωτικά συστατικά, μετά τα cranberries. Το χλωρογενικό οξύ ($C_{16}H_{18}O_9$, Mr= 354,31 g/mol) είναι το κύριο φαινολικό οξύ που υπάρχει στο μήλο, το οποίο σε σύγκριση με άλλες φαινολικές ενώσεις (κερτεσίνη, α-τοκοφερόλη, γαλλικό οξύ), έχει από τις υψηλότερες αντιοξειδωτικές ικανότητες. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μήλου εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία του φρούτου, τις συνθήκες καλλιέργειας, την επεξεργασία και την αποθήκευση. Όσο περισσότερες φαινολικές ενώσεις έχει το μήλο, τόσο μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζεται. Οι φαινολικές ενώσεις του μήλου διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: 1. Υδροξυβενζοϊκά οξέα (p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, πρωτοκατεκινικό οξύ), 2. Υδροξυκινναμωνικά οξέα (p-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, χλωρογενικό οξύ), 3. Φλαβονόλες (κερτεσίνη), 4. Φλαβανόλες-3 (κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη), 5. Ανθοκυάνες (κυανιδίνη) και 6. Φλαβονόλες-3,4 (προκυανιδίνη). Γενικότερα, η φλούδα του μήλου είναι πλουσιότερη σε ολικά φαινολικά συστατικά, ολικές προκυανιδίνες και ολικά φλαβονοειδή σε σύγκριση με τη σάρκα, ενώ ρόλο σε αυτό παίζει και η ποικιλία του μήλου. Ενδεικτικά, για τις ποικιλίες 'Fuji' και 'Elstar', η περιεκτικότητα σε χλωρογενικό οξύ για τη φλούδα βρέθηκε στα 1,21 και 0,26 mg/g νωπού βάρους, αντίστοιχα, ενώ για τη σάρκα βρέθηκε στα 10,79 mg/g νωπού βάρους και 2,9 mg/100 g νωπού βάρους, αντίστοιχα. (Kalinowska et al., 2014)



Εικόνα 1. 4 Χλωρογενικό οξύ (Sigma-Aldrich)

Από την άλλη, οι φλοιοί του πορτοκαλιού είναι επίσης πηγές φαινολικών συστατικών, περιλαμβάνοντας φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινόλες, αποτελούμενες από δύο δακτυλίους βενζολίου και έναν

ετεροκυκλικό δακτύλιο (C_6-C_3-C_6) και διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: 1. Πολυμεθοξυλιωμένες φλαβόνες (σινενσετίνη, νομπιλετίνη, τανζεριτίνη), 2. Γλυκοζυλιωμένες φλαβόνες (διοσμίνη, ρουτίνη) και 3. Γλυκοζυλιωμένες φλαβανόνες (ναριρουτίνη, εσπεριδίνη). Η εσπεριδίνη ($C_{28,}H_{34}O_{15}$, Mr= 610,57 g/mol), είναι το κυρίαρχο φλαβονοειδές της φλούδας του πορτοκαλιού και ειδικότερα του λευκού τμήματος (35,2 mg/g ξηρού βάρους), ενώ δομικά αποτελείται από τη φλαβονοεσπεριτίνη και το δισακχαρίτη της ρουτινόζης. Άλλα φλαβονοειδή που απαντούν στη φλούδα του πορτοκαλιού σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι η ναριρουτίνη (26,9 mg/g ξηρού βάρους) η νεοεσπεριδίνη (7,9 mg/g ξηρού βάρους) και η ναργινίνη (5,1 mg/g ξηρού βάρους), διαθέτοντας αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιισταμινικές ιδιότητες. (Sawalha et al., 2009)



Εικόνα 1. 5 Εσπεριδίνη (Sigma-Aldrich)

1.5 Συνηθισμένες και εναλλακτικές μέθοδοι αξιοποίησης των απόβλητων φρούτων

Τα απόβλητα του μήλου και του φλοιού του πορτοκαλιού έχουν χρησιμοποιηθεί πολλάκις για την εξαγωγή (εκχύλιση, διαχωρισμός) διαφόρων συστατικών, όπως είναι οι πηκτίνες, τα αντιοξειδωτικά συστατικά, τα αιθέρια έλαια και τα καροτενοειδή. Αναφορικά, οι βιοδραστικές ιδιότητες του D-λιμονένιου το καθιστούν αξιοποιήσιμο συστατικό, με πολλές εφαρμογές σε τρόφιμα, στην φαρμακευτική και την καλλυντική βιομηχανία, ως αρωματική ουσία, με τις έρευνες κάνουν λόγο για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες, ενώ από την άλλη οι ιδιότητες της ζελατινοποίησης και της σταθεροποίησης καθιστούν την πηκτίνη χρήσιμο συστατικό τροφίμων, όπως είναι οι μαρμελάδες και το παγωτό. (Ayala et al., 2017, Voragen et al., 2009) Πέρα από αυτά, ο τομέας της Βιοτεχνολογίας δύναται να αξιοποίησει τα απόβλητα αυτά με έναν τρόπο εναλλακτικό και να τα μετατρέψει σε άλλες βιοδραστικές ουσίες, όπως είναι η αιθανόλη, το μεθάνιο, το διοξείδιο του άνθρακα

μέσω αναερόβιων ζυμώσεων, διάφορες πρωτεΐνες, αμινοξέα και ένζυμα (πολυγαλακτουρονάση, κυτταρινάση), οξέα (κιτρικό, ηλεκτρικό οξύ) καθώς και διάφορες άλλες πτητικές αρωματικές ουσίες. (Wheatley 1990, Wicker et al., 1989)

Μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος επεξεργασίας των αποβλήτων είναι αυτή της παραγωγής χρωστικών ουσιών. Το χαμηλό κόστος των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, συμβάλλει όχι μόνο στη μείωση του ολικού κόστους της βιομηχανικής παραγωγής χρωστικών, αλλά και στην παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Συνεπώς, τόσο τα μήλα, όσο και οι φλοιοί πορτοκαλιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως στερεό και ως υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, με σκοπό την παραγωγή βιογενών χρωστικών ουσιών, καθώς αποτελούν μια παγκοσμίως εύκολα διαθέσιμη και χαμηλού κόστους, πρώτη ύλη.

1.6 Οι φυσικές και συνθετικές χρωστικές ουσίες στα τρόφιμα

Πρόσθετη ύλη τροφίμων είναι μια ουσία (ή μίγμα ουσιών), η οποία προστίθεται στα τρόφιμα και συμμετέχει στην παραγωγή, επεξεργασία, συσκευασία ή και αποθήκευση, χωρίς όμως να αποτελεί βασικό συστατικό. Οι πρόσθετες ύλες ή τα προϊόντα αποικοδόμησής τους γενικά παραμένουν στα τρόφιμα, αν και σε μερικές περιπτώσεις είναι πιθανό να απομακρυνθούν κατά την επεξεργασία. Η χρήση των πρόσθετων υλών ενισχύουν τη διατροφική αξία των τροφίμων (πρόσθετα όπως βιταμίνες και αμινοξέα), τη διατηρησιμότητα των τροφίμων (όπως τα αντιμικροβιακά πρόσθετα) και τέλος την οργανοληπτική ποιότητα των τροφίμων (όπως οι χρωστικές, οι αρωματικές ενώσεις και τα ενισχυτικά γεύσης). (Belitz et al., 1999)

Το χρώμα μαζί με τη γεύση, την υφή και την οσμή αποτελούν βασικές παραμέτρους για τον καθορισμό της ποιότητας των τροφίμων, όμως είναι δυνατόν να να υποβαθμιστούν κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση. Το χρώμα στα τρόφιμα οφείλεται είτε στην παρουσία φυσικών χρωστικών, είτε στο μεγάλο αριθμό συνθετικών ή και φυσικών χρωστικών που είναι διαθέσιμα για τη ρύθμιση και τη διόρθωση των αποχρωματισμών των τροφίμων. Οι κίτρινες και οι κόκκινες είναι αυτές που χρησιμοποιούνται κυρίως, ενώ τα προϊόντα που χρωματίζονται συχνά είναι τα γλυκά, τα αναψυκτικά, οι σκόνες επιδορπίων, τα δημητριακά, τα παγωτά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Στον πίνακα 1.1 που ακολουθεί, παρατίθεται ορισμένες

από τις φυσικές και συνθετικές χρωστικές που προστίθενται στα τρόφιμα. (Belitz et al., 1999)

Πίνακας 1.1 Παραδείγματα χρωστικών τροφίμων (φυσικών και συνθετικών)

Χρωστικές	**Αρ. Ευρωπαϊκής Ένωσης**	**Χρώμα**	**λ_{max} (nm)**	**Παραδείγματα χρήσης στην επεξεργασία τροφίμων**
		ΦΥΣΙΚΕΣ		
Ριβοφλαβίνη	E 101	Κίτρινο	445	Μαγιονέζες, σούπες, ζαχαρωτά
β - καροτίνιο	E 160a	Πορτοκαλί (έλαιο)	453-456	Λίπος, ποτά, σούπες, προϊόντα ζαχαροπλαστικής
Λυκοπίνιο	E 160d	Πορτοκαλί (έλαιο)	478	Μαγιονέζα, κέτσαπ, σάλτσες
Χλωροφύλλη	E 140	Πράσινο	412	Βρώσιμα έλαια
		ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ		
Ταρτραζίνη	E 102	Λεμονοκίτρινο	426	Σκόνες ζαχαροπλαστικής, παγωτά, αναψυκτικά
Καρνοϊσίνη	E 122	Ερυθρό με κυανίζουσα χροιά	-	Ποτά, προϊόντα ζαχαροπλαστικής, κέικς, παγωτά
Αμάρανθο	E 123	Ερυθρό με κυανίζουσα απόχρωση	520	Ποτά, προϊόντα ζαχαροπλαστικής, μαρμελάδες
Ερυθροσίνη	E 127	Βυσσινέρυθρο	527	Προϊόντα ζαχαροπλαστικής, μαρμελάδες, ζαχαρωτά

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον στις χρωστικές τροφίμων, οι οποίες προέρχονται από φυσικές πηγές, με τις συνθετικές χρωστικές να τείνουν να αντικατασταθούν πλήρως. Ο θετικός αντίκτυπος που αυτές οι φυσικές χρωστικές έχουν στην υγεία, καθώς και οι γενικότερες απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού για τη χρήση φυσικών προϊόντων, οδηγεί στη διερεύνηση νέων πηγών παραγωγή φυσικών χρωστικών. (Malik et al., 2012) Όμως η εποχική προμήθεια πρώτων υλών για την παραγωγή φυσικών χρωστικών και η έλλειψη σταθερότητάς τους σε παράγοντες όπως το pH, η επίδραση του φωτός και η διαλυτότητα, αποδεικνύει ότι οι προοπτικές τους στις βιομηχανίες των τροφίμων δεν είναι μεγάλες. Γι' αυτούς τους λόγους, ο προσανατολισμός στην εναλλακτική αξιοποίηση των φυσικών χρωστικών, παραγόμενων από μικροοργανισμούς, είναι εφαρμογές που μπορούν να επιφέρουν θετικά αποτελέσματα στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εν λόγω χρωστικών ουσιών.

1.7 Οι φυσικές χρωστικές από τη σκοπιά της Βιοτεχνολογίας

Οι μικροοργανισμοί συνδέονται με πληθώρα τροφίμων τα οποία καταναλώνονται από τον άνθρωπο και τα οποία παράγονται μέσω της διαδικασίας της ζύμωσης. Τα παραγόμενα από τους μικροοργανισμούς, προϊόντα όχι μόνο δύναται να χρησιμοποιηθούν ως πηγή τροφής αυτά καθ' αυτά, αλλά και ως συμπληρώματα διατροφής με τη μορφή αμινοξέων, βιταμινών, ενζύμων, οργανικών οξέων και χρωστικών. Γενικότερα, ο τομέας της Βιοτεχνολογίας έχει συμβάλλει στην σημαντικά στην αξιοποίηση αποβλήτων προς παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων. Αξιοσημείωτα παραδείγματα αποτελούν η παραγωγή μικροβιακού ελαίου από παραπροϊόντα βιομηχανιών ζαχαροπλαστικής με σκοπό τη μετέπειτα δυνητική παραγωγή βιοντίζελ (Tsakona et al. 2014), η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από απόβλητα χαρτοβιομηχανίας, το οποίο αποτελεί σημαντική πρόδρομη ουσία για την ανάπτυξη μιας βιώσιμης χημικής βιομηχανίας (Pateraki et al., 2016) και η παραγωγή PHB (πολυϋδροξυβουτυρικό) από παραπροϊόντα ηλίανθου, με στόχο την αντικατάσταση των πλαστικών προερχόμενα από πετρέλαιο. (Kachrimanidou et al., 2014)

Οι βιογενείς χρωστικές διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο για τις βιομηχανίες ως παράγοντες χρωματισμού διαφόρων τροφίμων, εξαιτίας της εύκολης και φθηνής παραγωγικής τους διαδικασίας, της εύκολης διαθεσιμότητάς τους, καθώς

επίσης και της υψηλής απόδοσής τους. Έτσι, οι χρωστικές προερχόμενες από μικροβιακές πηγές αποτελούν μια πρόσφορη και πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση. (Malik et al., 2012) Αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες πολυκετιδικής δομής, ενώ τα περισσότερα βακτήρια και μύκητες μελετώνται ευρέως λόγω των δυνατοτήτων που διαθέτουν για παραγωγή φυσικών χρωστικών. Ιδιότητες των χρωστικών αυτών, όπως είναι η αντικαρκινική τους δράση, ο αντιοξειδωτικός τους χαρακτήρας, το περιεχόμενό τους σε βιταμίνες και η σταθερότητά τους στο φως, τη θερμότητα και το pH, στρέφουν ολοένα και περισσότερο το ενδιαφέρον των βιομηχανιών τροφίμων προς την παραγωγή βιογενών χρωστικών ουσιών. Οι φυσικές αυτές χρωστικές μπορούν να ενθυλακωθούν σε παιδικές τροφές, δημητριακά, ζυμαρικά, σάλτσες και γαλακτοκομικά προϊόντα Επιπλέον, τα οφέλη των φυσικών χρωστικών δεν επιδρούν μόνο σε ανθρώπινο επίπεδο, αλλά και σε επίπεδο διατήρησης της βιοποικιλότητας, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται κατά την παραγωγή των συνθετικών χρωστικών, εξαιτίας του μεγάλου όγκου επιβλαβών χημικών ουσιών που εκλύονται προς το περιβάλλον. (Malik et al., 2012)

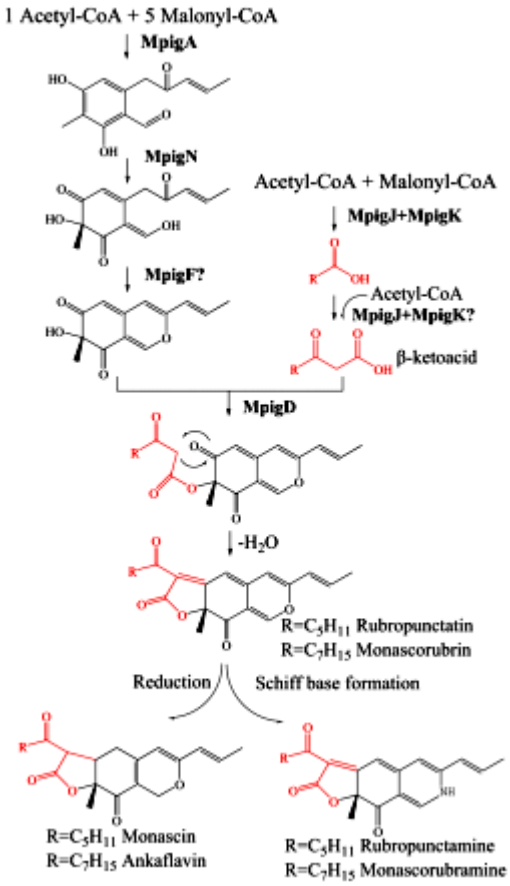
Ορισμένες από τις σημαντικότερες φυσικές χρωστικές ουσίες είναι τα καροτινοειδή, τα φλαβονοειδή και οι ξανθοφύλλες, με τη β-καροτίνη να αποτελεί την ουσία που χρησιμοποιείται περισσότερο από τις βιομηχανίες των τροφίμων και η οποία λαμβάνεται από ορισμένα κυανοβακτήρια. Μικροοργανισμοί, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να παράγουν, σε υψηλές αποδόσεις, χρωστικές, είναι τα είδη των *Monascus, Paecilomyces, Serratia, Cordyceps, Streptomyces,* ενώ κόκκινες-κίτρινες και μπλε χρωστικές παράγονται από τα είδη των *Penicillium herquei* και *Penicillium atrovenetum*. Επίσης τα είδη των *Rhodotorula, Sarcina, Cryptococcus, Monascus purpureus, Phaffia rhodozyma, Bacillus sp*., και *Achromobacter* έχουν την ικανότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού χρωστικών ουσιών. Μερικά παραδείγματα φυσικών χρωστικών, οι οποίες παράγονται από μικροοργανισμούς, είναι οι εξής: 1. Ριβοφλαβίνη, όπου πρόκειται για μια κίτρινη υδατοδιαλυτή βιταμίνη και η οποία μπορεί να παραχθεί από ασκομύκητες (*Ashbya gossypii*), από νηματοειδείς μύκητες (*Candida famata*) ή βακτήρια (*Bacillus subtilis*). 2. β-καροτίνη, όπου πρόκειται για μια πορτοκαλί χρωστική και η οποία μπορεί να παραχθεί κατόπιν ζύμωσης από το μύκητα *Blakeslea trispora*. 3. Καροτινοειδή, όπου πρόκειται για πορτοκαλοκόκκινες χρωστικές, γνωστές για τον αντιοξειδωτικό τους χαρακτήρα και οι οποίες μπορούν να παραχθούν από τα είδη των *Myxococcus, Streptomyces, Mycobacterium,*

Agrobacterium και *Sulfolobus* και 4. Ασταξανθίνη, όπου πρόκειται για μια πορτοκαλοκόκκινη χρωστική και η οποία μπορεί να παραχθεί από το ζυμομύκητα *Xanthophyllomyces dendrorhous* και τα φύκια *Heamatococcus pluvialis* και *Agrobacterium aurantiacum*. (Malik et al., 2012)

Συμπερασματικά, ο τομέας της Βιοτεχνολογίας μπορεί να διαδραματίσει ένα ουσιαστικό ρόλο στην παραγωγή των φυσικών χρωστικών μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Η σημασία της παραγωγής των φυσικών χρωστικών προερχόμενων από τους μικροοργανισμούς, αποκτά μια έννοια διττή, καθώς από τη μία τα τρόφιμα που τις περιέχουν, καθίστανται ελκυστικά από το ανθρώπινο μάτι και από την άλλη τα οφέλη που προσφέρουν τόσο στα τρόφιμα, όσο και στο περιβάλλον γενικότερα είναι ουσιαστικά και ιδιαίτερα σημαντικά.

1.8 Οι πολυκετιδικές δομές από μύκητες ως χρωστικές ουσίες τροφίμων

Όπως προηγουμένως έχει αναφερθεί, οι παραγόμενες, από μύκητες, χρωστικές αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες και οι οποίες από χημικής άποψης μπορούν να ταξινομηθούν στην κατηγορία των πολυκετιδίων και των καροτενοειδών. Τα μυκητιακά πολυκετίδια, δομικά κυμαίνονται από τετρακετίδια έως οκτακετίδια, τα οποία συμβάλλουν στην πολυκετιδική αλυσίδα. Πέρα από το βιοχημικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των πολυκετιδίων, αυτά συντίθενται και σε συνδυασμό με άλλες βιοχημικές οδούς, όπως είναι η βιοσύνθεση των αμινοξέων και των τερπενοειδών. Προκύπτουν με συμπύκνωση μιας ομάδας ακετυλίου (ακέτυλο-CoA) με μηλόνυλο ομάδα (μηλόνυλο-CoA) και ταυτόχρονη αποκαρβοξυλίωση σχηματίζοντας ένα χρωμοφόρο εξακετίδιο. Ταυτόχρονα, μέσω της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων, το β-κετοξύ και το οκτανοϊκό οξύ, τα οποία σχηματίζονται, αποκαρβοξυλιώνονται και συνδέονται με το χρωμοφόρο πολυκετίδιο, με αποτέλεσμα να προκύπτουν οι πορτοκαλί χρωστικές μονασκορουβρίνη και ρουβροπουκτανίνη, αντίστοιχα. Η περαιτέρω συμπύκνωση των πορτοκαλί χρωστικών μονασκορουβρίνη και ρουβροπουκτανίνη οδηγούν στη δημιουργία των κίτρινων χρωστικών ανκαφλαβίνη και μονασκίνη. Τέλος, η αμίνωση των κίτρινων χρωστικών ανκαφλαβίνη και μονασκίνη οδηγεί στη σύνθεση των κόκκινων χρωστικών μονασκορουβραμίνη και ρουβροπουκταμίνη. (Chen et al., 2015)



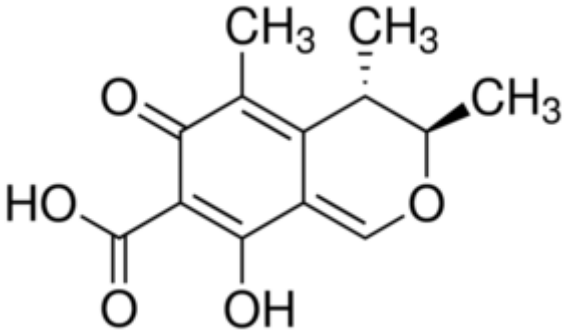
Εικόνα 1. 6 Βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης πολυκετιδικών δομών (Chen et al., 2015)

Οι πλέον αντιπροσωπευτικές κατηγορίες πολυκετιδικών δομών είναι οι ανθρακινόνες, οι υδροξυανθρακινόνες, οι ναφθοκινόνες και οι αζαφιλόνες, καθεμιά από τις οποίες παρουσιάζει μια σειρά διαφορετικών χρωματικών αποχρώσεων. Οι νηματοειδείς μύκητες αποτελούν τους μικροοργανισμούς εκείνους από τους οποίους μπορούν να παραχθούν πολυκετιδικές χρωστικές ουσίες, διαφορετικών χημικών δομών και ποικίλων αποχρώσεων. Μέχρι πρόσφατα, ο πλέον γνωστός μύκητας για αυτό ήταν τα στελέχη του *Monascus*, οι χρωστικές του οποίου χρησιμοποιούνται ευρέως από βιομηχανίες τροφίμων, ιδιαίτερα των Ανατολικών χωρών (Κίνα, Ιαπωνία, Κορέα, Ταϊλάνδη). Οι χρωστικές του *Monascus* περιλαμβάνουν έξι κύριες χρωστικές αζαφιλόνης: την ανκαφλαβίνη και μονασκίνη (κίτρινο), τη μονασκορουβρίνη και ρουβροπουκτανίνη (πορτοκαλί) και τη μονασκορουβραμίνη και ροβρουπουκταμίνη (κόκκινο). (Mapari et al., 2010)

1.9 Η περίπτωση της παραγόμενης τοξίνης, κιτρινίνη

Παρά το μεγάλο εύρος των βιολογικών ιδιοτήτων που καλύπτουν οι παραγόμενες, από τον *Monascus*, χρωστικές, όπως είναι οι αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες, έχουν ένα μειονέκτημα, το οποίο συνδέεται με τη συμπαραγωγή της μυκοτοξίνης, κιτρινίνη ή διαφορετικά μονασκιδίνη A ($C_{13}H_{14}O_5$, Mr= 250,25 g/mol). (Aguilar-Machado et al., 2017)

Η κιτρινίνη αποτελεί μια νεφροηπατική τοξίνη, η οποία έχει βρεθεί σε στελέχη του γένους *Monascus*. Η παραγωγή της κιτρινίνης επηρεάζεται από τη διαθέσιμη πηγή αζώτου, ενώ όσον αφορά στην τοξικότητά της, έχει βρεθεί από μελέτες ότι η θανατηφόρα δόση (LD_{50}) είναι 35-58 mg/kg για το ποντίκι, 50 mg/kg για τον αρουραίο και 134 mg/kg για το κουνέλι. Έτσι, η τοξικότητα των χρωστικών από τον *Monascus* οδήγησε σε αντιπαραθέσεις γύρω από την ασφάλεια της χρήσης τους στα τρόφιμα. Ο οργανισμός της EFSA (European Food Safety Authority) στην Ευρώπη δεν έχει εγκρίνει τη χρήση των χρωστικών αυτών, ενώ από την άλλη ο οργανισμός FDA (Food and Drug Administration) έχει θεσπίσει ως ανώτατο όριο της κιτρινίνης στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, το 0,02 mg/mL. (Hanika et al., 1994)



Εικόνα 1. 7 Κιτρινίνη (Sigma-Aldrich)

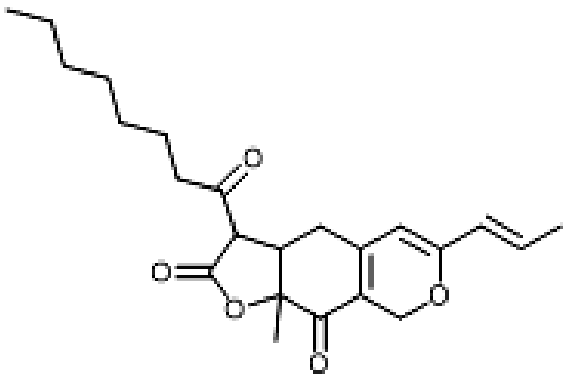
Βέβαια, από την άλλη μεριά υπάρχουν αναφορές σχετικά με την τοξικότητα των χρωστικών από τον *Monascus*. Ειδικότερα, η κίτρινη χρωστική ανκαφλαβίνη έχει δείξει επιλεκτική κυτταροτοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα, ενώ αντίθετα η μονασκίνη δεν έχει δείξει κυτταροτοξικότητα σε όλες τις εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές. Αυτό σημαίνει πως αυτές οι δύο αζαφιλόνες χρωστικές είναι ασφαλείς, αν

καταναλωθούν σε συγκεκριμένες και κατάλληλες δόσεις, ενώ η ανκαφλαβίνη αποτελεί χρωστικό λειτουργικό τρόφιμο. (Mapari et al., 2010)

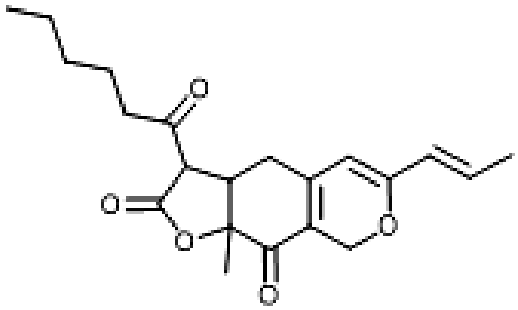
Η επιστημονική κοινότητα συνεπώς, στρέφεται προς τις κατευθύνσεις εκείνες με κριτήριο τη μη παραγωγή τοξινών και παράλληλα των παραγωγή χρωστικών, τόσο σε υγρά, όσο και σε στερεά υποστρώματα. Σήμερα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζεται στην παραγωγή κόκκινης χρωστικής από τα στελέχη του γένους *Penicillium sp.* και συγκεκριμένα τα στελέχη του *Penicillium purpurogenum.* Οι χρωστικές που παράγονται από αυτόν το μύκητα είναι διαλυτές, ευκόλως εκχυλιζόμενες, δεν συμπαράγεται η τοξίνη της κιτρινίνης ενώ αναπτύσσονται τόσο σε υγρά, όσο και στερεά υποστρώματα. (Aguilar-Machado et al., 2017)

1.10 Οι φυσικές χρωστικές με τη χρήση του μύκητα *Penicillium purpurogenum*

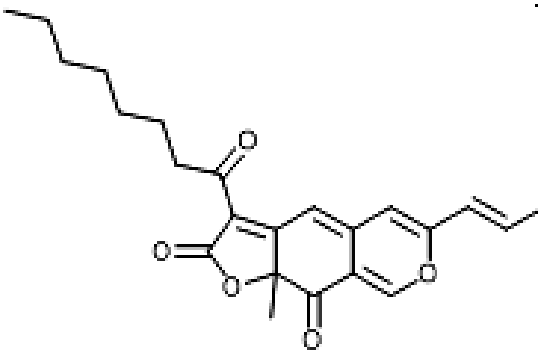
Μικροοργανισμοί που ανήκουν στο είδος του *Penicillium* αποτελούν εναλλακτικές πηγές παραγωγής φυσικών χρωστικών. Έρευνες έχουν δείξει ότι πολυκετιδικές αζαφιλόνες τύπου *Monascus*, χρωστικές μπορούν να παραχθούν και από του *Penicillium purpurogenum.* Τα στελέχη αυτά δεν παράγουν παράλληλα κιτρινίνη ή οποιαδήποτε άλλη μυκοτοξίνη, ενώ οι παραγόμενες χρωστικές είναι μη παθογόνες στο ανθρώπινο γένος, διαθέτοντας αντιμικροβιακές ιδιότητες. Οι δομές των χρωστικών αυτών φαίνονται παρακάτω.



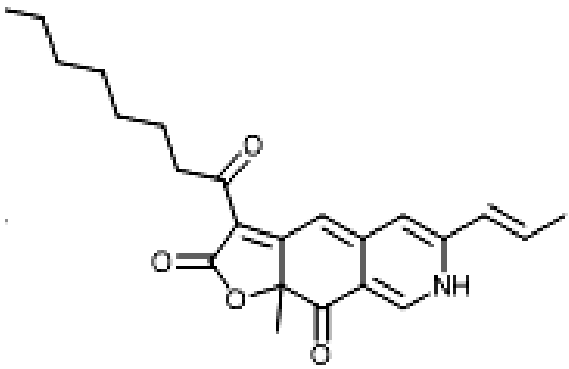
Εικόνα 1. 8 Ανκαφλαβίνη (κίτρινο) (Mapari et al., 2010)



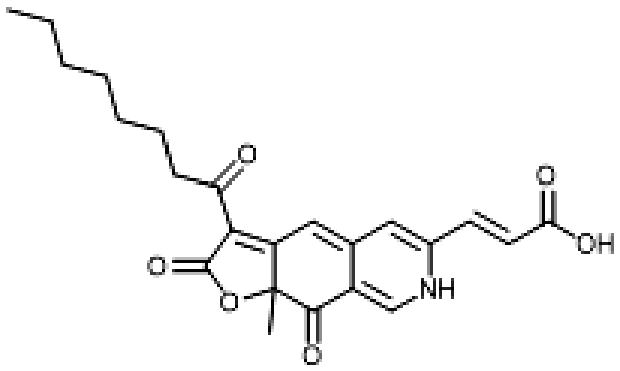
Εικόνα 1. 9 Μονασκίνη (κίτρινο) (Mapari et al., 2010)



Εικόνα 1. 10 Μονασκουβρίνη (κίτρινο) (Mapari et al., 2010)



Εικόνα 1. 11 Μονασκορουβραμίνη (κόκκινο-μωβ) (Mapari et al., 2010)



Εικόνα 1. 12 2-καρβόξυλο-μονασκορουβραμίνη (κόκκινο-μωβ) (Mapari et al., 2010)

Η σύνθεση των χρωστικών από μυκητιακά στελέχη επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, με μείζονος σημασίας ρόλο να διαδραματίζουν οι συνθήκες καλλιέργειας η θερμοκρασία, η τιμή του pH, το μέγεθος των κόκκων του υποστρώματος και η αρχική υγρασία, όσον αφορά στις ζυμώσεις στερεάς κατάστασης. Αντίστοιχα, στις υγρές καλλιέργειες σημαντικό ρόλο έχουν η ανάδευση, η συγκέντρωση του εμβολίου, η πηγή αζώτου και ο λόγος άνθρακας προς άζωτο (C/N). Επιπλέον, μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, εξίσου σπουδαία είναι η εκχύλιση και παραλαβή των χρωστικών ουσιών.

Το εμπορικό υπόστρωμα, στο οποίο ο μύκητας αναπτύσσεται βέλτιστα, είναι το Czapek-dox broth (30,0 g γλυκόζη, 3,0 g νιτρικό νάτριο-$NaNO_3$, 1,0 g θειικό κάλιο-K_2SO_4, 0,5 g γλυκεροφωσφορικό μαγνήσιο-$C_3H_7MgO_6P$ και 0,01 g δισθενής θειικός σίδηρος-$FeSO_4$ (II)), σε επωαστήρα υπό ανάδευση θερμοκρασίας 30 ^oC και 220 rpm, με το pH του υποστρώματος να είναι ρυθμισμένο στο 5. Η διάρκεια της ανάπτυξης του μικροοργανισμού και της παραγωγής της εξωκυτταρικής χρωστικής είναι 6 ημέρες. Μετά την παραγωγή της χρωστικής, μετράται η οπτική πυκνότητά της σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στα 500 nm, καθώς σε αυτό το μήκος κύματος η χρωστική απορροφά το μέγιστο φως. (Morales-Oyervides et al., 2015)

1.11 Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής

Μιας και οι χώρες του δυτικού κόσμου έχουν έρθει αντιμέτωπες τα τελευταία χρόνια με το ζήτημα της συσσώρευσης του μεγάλου όγκου των αποβλήτων, ιδιαίτερα του μήλου και του πορτοκαλιού στις λαϊκές αγορές, σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι η ολιστική αξιοποίηση αυτών.

Το ένα σκέλος αυτής της αξιοποίησης αφορά στην παραλαβή των διαφόρων προϊόντων προστιθέμενης αξίας (πηκτίνες, αντιοξειδωτικά συστατικά, αιθέρια έλαια) μέσω διαφόρων τεχνικών που θα μελετηθούν και θα βελτιστοποιηθούν στην πορεία της έρευνας και τα οποία δύναται να χρησιμοποιηθούν από τις βιομηχανίες των τροφίμων, της φαρμακευτικής και τον κλάδο της κοσμητολογίας. Με άλλα λόγια, στόχος είναι η δημιουργία ενός βιοδιυλιστηρίου. Το άλλο σκέλος έγκειται στην εκμετάλλευσή τους από τον τομέα της Βιοτεχνολογίας. Καθώς ολοένα και περισσότερο υπάρχει η τάση της αντικατάσταση των συνθετικών χρωστικών των τροφίμων, των φαρμάκων και των καλλυντικών από φυσικές, τα απομένοντα κλάσματα από τα βιοδιυλιστήρια των απόβλητων φρούτων θα αποτελέσουν το υπόστρωμα ανάπτυξης του νηματοειδούς μύκητα *Penicillium purpurogenum,* ο οποίος παράγει τριών ειδών χρωστικές ουσίες (κίτρινη, πορτοκαλί, κόκκινη). Αρχικά, θα πραγματοποιηθούν βελτιστοποιήσεις συνθηκών ανάπτυξης του μύκητα σε υγρές καλλιέργειες και θα εξεταστούν παράμετροι που επηρεάζουν την παραγωγή της χρωστικής. Στη συνέχεια, τα φυσικά σάκχαρα του μήλου και του φλοιού πορτοκαλιού θα αποτελέσουν τα υποστρώματα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε υγρές καλλιέργειες και σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης, αντίστοιχα. Τέλος, οι ζυμώσεις θα ολοκληρωθούν με την εκχύλιση των παραγόμενων χρωστικών, με τη χρήση διαφόρων οργανικών διαλυτών, καθώς επίσης και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισής τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός και υλικές υποδομές

Ο απαραίτητος εργαστηριακός εξοπλισμός (αντιδραστήρια, συσκευές, μηχανήματα, υλικά) για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης εξασφαλίστηκε από τα Εργαστήρια Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, καθώς και Χημείας Τροφίμων και Ανάλυσης, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.2 Μήλο – Πορτοκάλι

2.2.1 Πρώτη ύλη

Ως πρώτες ύλες χρησιμοποιήθηκαν απόβλητα μήλου και πορτοκαλιού, τα οποία συλλέχθηκαν από λαϊκή αγορά στην περιοχή της Βούλας, Αττικής.

2.2.2 Μελέτη σύστασης του μήλου και του πορτοκαλιού

Για την ανάλυση της σύστασης του μήλου, αρχικά πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των γιγάρτων από το βρώσιμο μέρος και κατόπιν το τελευταίο πολτοποιήθηκε. Ο πολτός περιελάμβανε τόσο τη σάρκα του φρούτου, όσο και τη φλούδα. Όσον αφορά στο πορτοκάλι, σε αυτό πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός της φλούδας από το βρώσιμο μέρος του φρούτου και στη συνέχεια και οι φλούδες έλαβαν τη μορφή του πολτού.

Για τις αναλύσεις, όπως η μέτρηση του ποσοστού περιεχόμενης υγρασίας, των πρωτεϊνών, του λίπους και της τέφρας, μέρος των πολτών των δύο φρούτων υποβλήθηκε σε ξήρανση υπό κατάψυξη (λυοφιλίωση) διάρκειας 24 ωρών, προκειμένου να ληφθεί το ξηρό μέρος αυτών. Η αρχή της λυοφιλίωσης βασίζεται στην μετάβαση του νερού από τη στερεά κατάσταση (πάγος) στην αέρια (υδρατμός), δηλαδή την εξάχνωση, λόγω της χαμηλής πίεσης που επικρατεί (10^{-4} bar) στον κυλινδρικό οριζόντιο θάλαμο. Το τρόφιμο πρώτα καταψύχεται και στην συνέχεια

αφυδατώνεται, διατηρώντας αναλλοίωτα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του. (Γιαννιώτης, 2011)

Εικόνα 2. 1 Ξηρό δείγμα μήλου, μετά τη λυοφιλίωση

Εικόνα 2. 2 Ξηρό δείγμα φλούδας πορτοκαλιού, μετά τη λυοφιλίωση

Η μέθοδος μέσω της οποίας προσδιορίστηκε το ποσοστό των πρωτεϊνών, ήταν η μέθοδος Kjeldhal και η οποία στηρίζεται στην ολική μετατροπή των αρχικών μορφών αζώτου (N) σε στοιχειακό άζωτο ή αμμωνιακό άλας, στην πλήρως ανοιγμένη του μορφή. (Βουδούρης, 2004) Πιο συγκεκριμένα, μέσα με μακρύλαιμο σωλήνα τοποθετήθηκαν ποσότητα ξηρού δείγματος (0,5 g) μέσα σε ριζόχαρτο, μια ταμπλέτα Kjeldhal (96,5 % θειικό νάτριο-Na_2SO_4, 1,5 % θειικός χαλκός-$CuSO_4$ και 2,00 %

σελήνιο-Se), η οποία έδρασε ως καταλύτης της αντίδρασης, 25 mL πυκνό θειικό οξύ (H_2SO_4) για την οξείδωση της οργανικής ύλης και 2 σταγόνες αντιαφριστικό διάλυμα. Με ισχυρό βρασμό, διάρκειας 1 ώρας στους 410 ^oC, το περιεχόμενο του σωλήνα χωνεύτηκε και διαλυτοποιήθηκε πλήρως. Ο στόχος της πέψης είναι είναι η διάσπαση όλων των δεσμών αζώτου του τροφίμου και η μετατροπή του σε ιόντα αμμωνίου (NH_4^+). Ακολούθησε το στάδιο της απόσταξης, για το οποίο η παρασκευή διαλύματος βορικού οξέος (H_3BO_3) ήταν απαραίτητη. 40 g στερεού H_3BO_3, 10 mL διαλύματος δείκτη πράσινο της βρωμοκρεσόλης (1 g/L) και 7 mL διαλύματος δείκτη ερυθρό του μεθυλίου (1 g/L), με το νερό να συμπληρώνει τον όγκο μέχρι το 1 L, αναδεύτηκαν για 12 ώρες περίπου. Κατά τη διεργασία της απόσταξης, σε κωνική φιάλη των 250 mL προστέθηκαν 50 mL διαλύματος H_3BO_3 (φούξια χρώμα) και αυτή τοποθετήθηκε στην ειδική υποδοχή της συσκευής απόσταξης (Foss, Kjeltec 8100, Distillation unit). Για τον μακρύλαιμο σωλήνα, στον οποίο είχε λάβει χώρα η πέψη, η συσκευή απόσταξης διέθετε επίσης μια ειδική υποδοχή για αυτόν. Μετά το πέρας των 5 λεπτών της απόσταξης, το διάλυμα H_3BO_3 είχε αποκτήσει πράσινο χρώμα, λόγω της επίδρασης των δεικτών και του διαλύματος NaOH (40 % w/v), με τα ιόντα του NH_4^+ να έχουν μετατραπεί σε NH_3. Η ανάλυση της Kjeldhal ολοκληρώθηκε με την τιτλοδότηση του δείγματος με διάλυμα HCl κανονικότητας 0,1 N. (PanReac, AppliChem ITW Reagents) Από το ποσό του δεσμευθέντος οξέος υπολογίστηκε το ποσό της αποσταχθείσας αμμωνίας και από αυτήν το ποσό του αζώτου στο αρχικό δείγμα. Η συνολική πρωτεΐνη του δείγματος υπολογίστηκε κατόπιν πολλαπλασιασμού του συνολικού αζώτου με τον εμπειρικό συντελεστή 6,25, ο οποίος για τα μήλα και τα πορτοκάλια είναι στο 5,64. (Levey et al., 2000, Βουδούρης, 2004) Το ποσοστό της πρωτεΐνης βρέθηκε από τη σχέση %Πρωτεΐνης= (%N)*5,64, όπου

$$\%\,\mathrm{N} = \frac{(\mathrm{mL\ \ \delta\epsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma} - \mathrm{mL\tau\upsilon\varphi\lambda o\acute{\upsilon}})*0{,}1\ \mathrm{N}*14{,}007}{\mathrm{mg\delta\epsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma}}*100$$

Συνεπώς, οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, κατά τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών μέσω της Kjeldhal, είναι οι παρακάτω.

<u>1° Στάδιο: Πέψη</u>

$N_{\tau\rho o\varphi\acute{\iota}\mu o\upsilon}$ + π.H_2SO_4 → $(NH_4)_2SO_4$ + H_2O + CO_2↑ (Καταλύτης της αντίδρασης Cu^{2+} και επίδραση θέρμανσης)

2ο Στάδιο: Απόσταξη

$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \leftrightarrow 2NH_3\uparrow + Na_2SO_4 + 2H_2O$

3ο Στάδιο: Τιτλοδότηση

$B(OH)_4^- + HCl \leftrightarrow Cl^- + B(OH)_3 + H_2O$ (PanReac, AppliChem ITW Reagents)

Εικόνα 2. 3 Συσκευή πέψης για την ανάλυση της Kjeldhal

Εικόνα 2. 4 Συσκευή απόσταξης για την ανάλυση της Kjeldhal

Επιπλέον, για την εύρεση του ποσοστού λίπους, επιλέχθηκε η συνεχής εκχύλιση στερεού/υγρού, κατά την οποία το προς εκχύλιση ξηρό τρόφιμο τοποθετήθηκε σε ειδικό φυσίγγιο, το οποίο με τη σειρά του τοποθετήθηκε στον εκχυλιστήρα της συσκευής Soxhlet. Ο εκχυλιστήρας στη μία πλευρά του φέρει κυλινδρικό βραχίονα μεγάλης διαμέτρου, ενώ στην άλλη σιφωνοειδή βραχίονα μικρής διαμέτρου. Επιπλέον, στο επάνω μέρος ο εκχυλιστήρας συνδέθηκε με ψυκτήρα, ενώ στο κάτω με σφαιρική φιάλη που περιείχε το διαλύτη. Ο διαλύτης που κρίθηκε κατάλληλος, ήταν το εξάνιο. Κατά την εκχύλιση κατά Soxhlet, ο διαλύτης εκχυλίζει το στερεό αφού ψυχθεί, χωρίς να προκαλεί αλλοιώσεις στο τρόφιμο λόγω της υψηλής θερμοκρασίας. Η εκχύλιση διήρκησε 4 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας, ο διαλύτης του εξανίου εξατμίστηκε, με τη χρήση του περιστροφικού εξατμιστήρα (Buchi Rotavapor, R – 114), παρέχοντας έτσι το βάρος του λίπους που εκχυλίστηκε από το τρόφιμο. Το ποσοστό του λίπους που εκχυλίστηκε, υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\%\ \text{λίπους} = \frac{\text{Βάρος φιάλης+δείγμα (g)} - \text{Βάρος κενής φιάλης (g)}}{\text{Βάρος δείγματος (g)}} * 100 \text{ (Khan et al., 2010)}$$

Εικόνα 2. 5 Εκχύλιση λίπους κατά Soxhlet, στο μήλο

Εικόνα 2. 6 Εκχύλισης λίπους κατά Soxhlet, στις φλούδες πορτοκάλι

Παράλληλα, η συσκευή Soxhlet χρησιμοποιήθηκε και για την εκχύλιση μη δομικών συστατικών, τόσο του μήλου, όσο και του πορτοκαλιού, η παρουσία των οποίων θα λειτουργούσαν παρεμποδιστικά στις μετέπειτα μεθόδους ανάλυσης. Υπερκάθαρο νερό (dd H_2O) και αιθανόλη (EtOH, 96 %) αποτέλεσαν τους διαλύτες μέσω των οποίων πραγματοποιήθηκαν οι εκχυλίσεις αυτές. Ανόργανα συστατικά, μη δομικοί υδατάνθρακες και αζωτούχες ύλες, όντας υδατοδιαλυτά συστατικά, εκχυλίστηκαν μετά των πέρας των 24 ωρών, με το νερό, ενώ από την άλλη διάφοροι κηροί και ιχνοστοιχεία παρασύρθηκαν από τον οργανικό διαλύτη της αιθανόλης, συμπληρώνοντας επιπλέον 16 ώρες εκχύλισης. (Sluiter et al., 2008)

Στα προκύπτοντα υδατοδιαλυτά εκχυλίσματα μελετήθηκε ποσοτικά και φασματοφωτομετρικά, η περιεκτικότητα σε ανόργανο φώσφορο (IP-Inorganic phosphorus) και σε άζωτο ελευθέρων αμινομάδων (FAN-Free Amino Nitrogen), καθώς επίσης και η ποσότητα των ελευθέρων σακχάρων της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης που τυχόν είχαν εκχυλιστεί. Για την πραγματοποίηση των αναλύσεων αυτών, τα υδατοδιαλυτά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL, με τον όγκο μέχρι τη χαραγή της φιάλης να συμπληρώνεται με δισαπεσταγμένο νερό (dd H_2O). Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω αναλύσεων, το νερό, με τα υδατοδιαλυτά εκχυλίσματα της εκχύλισης κατά Soxhlet, εξατμίστηκε

σε περιστροφικό εξατμιστήρα και το βάρος των απομενόντων στερεών υπολειμμάτων καταγράφηκε.

Από την άλλη, στα εκχυλίσματα της αιθανόλης, οι αναλύσεις οι οποίες έγιναν, περιελάμβαναν αρχικά την ξήρανση του δείγματος, το οποίο ήταν τοποθετημένο στο φυσίγγιο, μέσω της λυοφιλίωσης. Ακόμα, και σε αυτή την περίπτωση, ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε με τη χρήση του περιστροφικού εξατμιστήρα και πέρα από το βάρος των στερεών υπολειμμάτων το οποίο μετρήθηκε, προσδιορίστηκαν και τα μεθανολικά εκχυλίσματα. Η προσθήκη ποσότητας μεθανόλης για αυτό το σκοπό, αποτέλεσε λυσιτελές βήμα για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteau, καθώς ακόμα και για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, με τη χρήση του διαλύματος DPPH, δίνοντας έτσι μία εικόνα του φαινολικού προφίλ των, υπό μελέτη, φρούτων.

Εν συνεχεία, το πορτοκάλι υποβλήθηκε σε μια ακόμα μέθοδο ανάλυσης της σύστασής του, αυτή του προσδιορισμού της περιεκτικότητάς του σε λιγνίνη, κυτταρίνη κι ημικυτταρίνη. Ως δείγμα για αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ξηρή, μετά την εκχύλιση κατά Soxhlet με νερό και αιθανόλη, φλούδα πορτοκαλιού. Ο προσδιορισμός των παραπάνω πολυσακχαριτών στηρίζεται στην όξινη υδρόλυσή τους. Συγκεκριμένα, ποσότητα ξηρού δείγματος (0,3 g) τοποθετήθηκε σε φιάλη αναεροβίωσης και προστέθηκαν 3 mL H_2SO_4 συγκέντρωσης 72% v/v. Στη συνέχεια, αυτή παρέμεινε σε υπό ανάδευση υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 ^oC, για μία ώρα. Μετά το πέρας της μίας ώρας, 84 mL δισαπεσταγμένο νερό (dd H_2O) προστέθηκαν και κατόπιν η φιάλη τοποθετήθηκε σε αυτόκλειστο για αποστείρωση διάρκειας μίας ώρας. Αφού η αποστείρωση ολοκληρώθηκε, μέσω ηθμού Buchner το περιεχόμενο της φιάλης διηθήθηκε και η ποσότητα των στερεών υπολειμμάτων τοποθετήθηκε για ξήρανση σε φούρνο στους 88^oC για 24 ώρες, με την ποσότητα του όξινα αδιάλυτου υπολείμματος να προσδιορίζεται. Η ποσότητα της όξινης αδιάλυτης λιγνίνης στο πορτοκάλι προσδιορίστηκε από τη μέτρηση του βάρους της τέφρας, όταν το στερεό υπόλειμμα της ξήρανσης στους 88 ^oC τοποθετήθηκε σε πυριαντήριο στους 575 ^oC για ακόμα 24 ώρες. Όσον αφορά στην όξινη διαλυτή λιγνίνη, αυτή μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis, στο φάσμα του υπεριώδους, στα 320 nm, ενώ ως δείγμα για αυτό χρησιμοποιήθηκε το διήθημα κατά τη διήθηση μέσω του ηθμού Buchner. Ακόμα, τα μόρια γλυκόζης, τα οποία προέκυψαν από τη διάσπαση του β-

γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ του ημιακεταλικού υδροξυλίου (-OH) του ενός μορίου και του υδροξυλίου του 4^{ου} ατόμου άνθρακα του άλλου μορίου, προσδιορίστηκαν μέσω της HPLC με τη χρήση της στήλης Aminex, καθώς και με τη χρήση της στήλης Sodex, δίνοντας αξιόπιστα αποτελέσματα για την ποσότητα της κυτταρίνης που υφίσταται στο πορτοκάλι. Επίσης, από τις στήλες της Aminex και της Sodex προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις σε γλυκόζη, ξυλόζη, μαννόζη και γαλακτόζη, προκύπτοντα μονομερή της υδρόλυσης της ημικυτταρίνης. (Sluiter et al., 2008)

Ολοκληρώνοντας τις αναλύσεις στο ξηρό δείγμα, όσον αφορά στον προσδιορισμό της τέφρας, μέρος του ξηρού, από τη λυοφιλίωση, πολτού, τόσο του μήλου, όσο και του πορτοκαλιού, τοποθετήθηκε σε προζυγισμένες κάψες σε πυριαντήριο στους 575 ^{o}C για 16 ώρες, ώστε μετά την πλήρη οξείδωση της οργανικής ύλης, να έχει παραμείνει μόνο το ανόργανο υπόλειμμα του τροφίμου, ενώ νερό και πτητικά συστατικά εξατμίστηκαν. (Nielsen, 2003)

Πέρα από τις προαναφερθείσες αναλύσεις, μελετήθηκαν ακόμα η περιεκτικότητα των πολτών μήλου και πορτοκαλιού σε ανόργανο φώσφορο, άζωτο ελεύθερων αμινομάδων και ελεύθερα σάκχαρα -σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, ενώ μετρήθηκε και η τιμή του pH με τη χρήση ηλεκτροδίου. Για την πραγματοποίηση των αναλύσεων αυτών, ο πολτός του μήλου φυγοκεντρήθηκε σε φυγόκεντρο (Zentrifugen, Hettich, Universal 320R) για 10 λεπτά, ενώ η θερμοκρασία και οι στροφές της συσκευής είχαν ρυθμιστεί στους 4 ^{o}C και τις 9000 στροφές (rpm)/min, αντίστοιχα. Στα προκύπτοντα υπερκείμενα και των δύο φρούτων μετά τη φυγοκέντριση, προσδιορίστηκε ο ανόργανος φώσφορος και το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων, ενώ η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη μετρήθηκε μέσω της HPLC. Στο ίζημα, το οποίο προέκυψε από την πρώτη φυγοκέντριση του πολτού του μήλου, προστέθηκε νερό και φυγοκεντρήθηκε ξανά, με σκοπό την έκπλυση του πολτού. Ο πολτός εκπλύθηκε συνολικά δύο φορές, ενώ η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα προκύπτοντα υπερκείμενα της εκάστοτε φυγοκέντρισης, ήταν αυτή του προσδιορισμού των σακχάρων, μέσω της HPLC.

Η τελευταία ανάλυση της μελέτης της σύστασης του μήλου και του πορτοκαλιού ήταν η μέτρηση της πυκνότητας του πολτού, κατά την οποία μετρήθηκε πόσο βάρος του δείγματος αντιστοιχεί στον όγκο ογκομετρικής φιάλης των 100 mL.

2.2.3 Εκχύλιση των ελεύθερων σακχάρων με νερό, από το μήλο

Καθώς τα ελεύθερα σάκχαρα αποτελούν ένα από τα κυριότερα συστατικά του μήλου και εφόσον αυτά αποτέλεσαν την πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium purpurogenum* και την παραγωγή εξωκυτταρικής χρωστικής από αυτόν, κρίθηκε απαραίτητη η έκπλυση του πολτού με νερό, με σκοπό την εκχύλιση των σακχάρων. Ως δείγμα χρησιμοποιήθηκε ο πολτός του μήλου. Οι αναλογίες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αραίωσή του, ήταν 1:10, 1:20 και 1:40 w/v (βάρος ξηρού κατ' όγκο). Ο αραιωμένος πολτός της κάθε αναλογίες προστέθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL και τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα υπό ανάδευση στους 33 ^{o}C, για μια ώρα. Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας, οι αραιωμένοι πολτοί διηθήθηκαν και στα υπερκείμενα που προέκυψαν, αναλύθηκε μέσω HPLC, η περιεκτικότητα σε σάκχαρα, ενώ το υπόλοιπο υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μύκητα.

2.2.4 Εκχύλιση των αντιοξειδωτικών συστατικών από τα, υπό μελέτη, φρούτα

Για την επίτευξη της εκχύλισης των αντιοξειδωτικών συστατικών από το υπόλοιπο δείγμα, έγινε χρήση του διαλύτη αιθανόλης (EtOH, 70 %), καθώς και οξινισμένης αιθανόλης (EtOH 70 %-HCl 0,01 M), ενώ ως δείγμα επιλέχθηκε το ξηρό μέρος του μήλου και το οποίο είχε προκύψει από την ξήρανση υπό κατάψυξη. Οι αραιώσεις, στις οποίες πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών, ήταν 1:80, 1:40 και 1:20 w/v (βάρος ξηρού κατ' όγκο). Τα δείγματα του ξηρού πολτού και οι διαλύτες προστέθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL, σε τελικό όγκο 50 mL και κατόπιν τοποθετήθηκαν στον υπό ανάδευση, επωαστήρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες. Μετά το πέρας των 2 ωρών, τα δείγματα διηθήθηκαν και στο υπερκείμενο αυτών, έγιναν αναλύσεις όπως προσδιορισμός σακχάρων μέσω HPLC και προσδιορισμός της ολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά, μέσω της φωτομετρικής μεθόδου Folin-Ciocalteau.

Επιπλέον τα φαινολικά συστατικά του πολτού του μήλου επιλέχθηκαν να εκχυλιστούν μετά την έκπλυση, των ελεύθερων σακχάρων με νερό, κάνοντας χρήση διαφόρων διαλυτών, καθώς ακόμα και σε διάφορες αναλογίες. Οι διαλύτες που επιλέχθηκαν, ήταν η αιθανόλη (EtOH, 70 %), η οξινισμένη αιθανόλη (EtOH 70 %-HCl 0,01 M), η μεθανόλη (MeOH, 70 %) και η οξινισμένη μεθανόλη (MeOH 70 %-

HCl 0,01 M). Ως δείγμα χρησιμοποιήθηκε το ίζημα της έκπλυσης των σακχάρων, μετά τη διήθηση του αραιωμένου πολτού, ενώ για το διαχωρισμό των φαινολικών συστατικών έγινε η χρήση τόσο του υπό ανάδευση επωαστήρα, όσο και του υδατόλουτρου υπερήχων (ultrasonic waterbath). Οι αναλογίες των διαλυτών για τον επωαστήρα και τους υπερήχους ήταν 1:20 και 1:40 w/v και 1:10 και 1:20 w/v (βάρος ξηρού κατ' όγκο), αντίστοιχα, ενώ η διάρκεια της εκχύλισης ήταν 2 και 1 ώρες, αντίστοιχα, επίσης. Μετά το πέρας της διεργασίας, τα δείγματα διηθήθηκαν και στα υπερκείμενα έγινε η ανάλυση Folin-Ciocalteau, προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία του διαχωρισμού των αντιοξειδωτικών συστατικών από το υπόλοιπο δείγμα.

Εν τέλει, τα φαινολικά συστατικά του πολτού του μήλου διαχωρίστηκαν από το ίζημα της έκπλυσης των σακχάρων. Ο διαλύτης, ο οποίος κρίθηκε κατάλληλος, ήταν αυτός της οξινισμένης αιθανόλης, σε αναλογία 1:20 w/v (βάρος ξηρού κατ' όγκο). Κωνικές φιάλες των 250 mL που περιείχαν τα δείγματα, τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων για 1 ώρα.

Όσον αφορά στις φλούδες πορτοκάλι, τα αντιοξειδωτικά συστατικά αυτών διαχωρίστηκαν από το υπόλοιπο δείγμα με τον ίδιο οργανικό διαλύτη που επιλέχθηκε για το μήλο (EtOH-HCl) και στις ίδιες συνθήκες (υδατόλουτρο υπερήχων για 1 ώρα), ενώ η αναλογία του διαλύτη ως προς το δείγμα ήταν 1:25 w/v.

Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας διαχωρισμού, τα δείγματα διηθήθηκαν και στα υπερκείμενα έγινε η ανάλυση Folin-Ciocalteau, για διαπίστωση του επιτυχούς διαχωρισμού των αντιοξειδωτικών συστατικών από το υπόλοιπο δείγμα. Επιπλέον, για μεγαλύτερη ακρίβεια των φαινολικών προφίλ των υπερκειμένων, τόσο στο μήλο, όσο και στο πορτοκάλι πραγματοποιήθηκαν δύο ακόμα αναλύσεις. Αυτές έλαβαν χώρα κατόπιν εξάτμισης του υπερκειμένου σε περιστροφικό εξατμιστήρα, σε χαμηλή θερμοκρασία, και προσθήκης ποσότητας μεθανόλης στο εναπομένον στερεό υπόλειμμα, έως πλήρους διαλυτοποίησής του. Στα προκύπτοντα μεθανολικά εκχυλίσματα ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του δείγματος, μέσω της χρήσης του διαλύματος DPPH, καθώς και η μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteau, έδωσαν μια ολοκληρωμένη εικόνα των αντιοξειδωτικών συστατικών των δειγμάτων.

Εικόνα 2.7 Στερεό υπόλειμμα, μετά την εξάτμιση του διαλύτη EtOH-HCl, κατά την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών στο μήλο

Εικόνα 2.8 Στερεό υπόλειμμα, μετά την εξάτμιση του διαλύτη EtOH-HCl, κατά την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών στις φλούδες πορτοκαλιού

2.2.5 Διαχωρισμός πηκτινών από το μήλο

Ο διαχωρισμός των πηκτινών από το μήλο αποτέλεσε και το τελευταίο στάδιο του βιοδιυλιστηρίου και ως δείγμα για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ήταν το ίζημα, το οποίο προέκυψε από το διαχωρισμό των φαινολικών συστατικών, με τη χρήση των υπερήχων. Ο τρόπος που επιλέχθηκε για την εκχύλιση των πηκτινών, ήταν αυτός της όξινης υδρόλυσής τους, με τη χρήση αντιδραστηρίων. Αρχικά η τιμή του pH του, αραιωμένου με νερό, δείγματος ρυθμίστηκε, μέσω διαλύματος H_2SO_4 (5 M),

στο 1,5, τοποθετήθηκε στη συνέχεια σε υδατόλουτρο, θερμοκρασίας 90 ºC για 2 ώρες και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε. Το ίζημα, το οποίο προέκυψε από τη φυγοκέντριση δύναται να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή της χρωστικής. Αντίθετα, στο υπερκείμενο η τιμή του pH ρυθμίστηκε στο 3,5, μέσω διαλύματος NaOH (1 M), προστέθηκε ποσότητα αιθανόλης (EtOH, 97 %), τρεις φορές του όγκου του υπερκειμένου και τέλος, φυγοκεντρήθηκε. Το ίζημα που προέκυψε εκπλύθηκε και φυγοκεντρήθηκε ακόμα δύο φορές με αιθανόλη (70 % και 97 %) και έτσι τελικά ελήφθησαν οι πηκτίνες. (Garna et al., 2007)

Εικόνα 2. 9 Πηκτίνες, μετά τις εκπλύσεις με EtOH (70 και 97%)

Εικόνα 2. 10 Πηκτίνες, μετά την ξήρανσή τους, υπό κατάψυξη

Προκειμένου να χαρακτηριστεί ως επιτυχής η διεργασία εκχύλισης των πηκτινών, κρίθηκε απαραίτητη η ανάλυση των δειγμάτων. Αρχικά, οι ληφθείσες, κατόπιν έκπλυσης με την αιθανόλη, πηκτίνες έλαβαν την ξηρή μορφή τους, μέσω της διαδικασίας της λυοφιλίωσης. Καθώς οι πηκτίνες απαρτίζονται από μακριές αλυσίδες του πολυγαλακτουρονικού οξέος, οι καρβοξυλομάδες του οποίου είναι εν μέρει εστεροποιημένες με μεθυλική αλκοόλη (CH_3OH), η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, ήταν εκείνη του προσδιορισμού του ποσοστού του βαθμού εστεροποίησης των δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή είναι μια ποσοτική μέθοδος ανάλυσης και η οποία στηρίζεται σε τιτλοδοτήσεις. Σύμφωνα με αυτή, μικρή ποσότητα δείγματος (0,1 g) εμβαπτίστηκε με αιθανόλη και κατόπιν, με την προσθήκη ποσότητας νερού (20 mL), διαλύθηκε σε θερμοκρασία 40 ^{o}C. Η προσθήκη σταγόνων δείκτη φαινολοφθαλεϊνης 1% στη συνέχεια αποτέλεσε καταλυτικό βήμα για την πραγματοποίηση της τιτλοδότησης με διάλυμα NaOH συγκέντρωσης 0,1 M και ο όγκος κατανάλωσης της βάσης καταγράφηκε (V_1). Αφού το δείγμα αφέθηκε για 20 λεπτά, προστέθηκε ποσότητα HCl συγκέντρωσης 0,1 M, μέχρι πλήρους εξαφάνισης του ροζ χρώματος του τιτλοδοτημένου δείγματος. Μετά την προαναφερθείσα εξουδετέρωση, η επανάληψη προσθήκης σταγόνων φαινολοφθαλεϊνης και ογκομέτρησης του δείγματος με το διάλυμα της βάσης (V_2), αποτέλεσαν τα τελικά στάδια της μεθόδου ανάλυσης. Το ποσοστό του βαθμού εστεροποίησης των πηκτινών προσδιορίστηκε από το πηλίκο του όγκου V_2 προς το άθροισμα των δύο όγκων V_1 και V_2, πολλαπλασιασμένο επί 100, δηλαδή % Βαθμού εστεροποίησης = $\frac{V2}{(V1+V2)} * 100.$ (Wai et al., 2010)

2.2.6 Απόσταξη D-λιμονένιου από τις φλούδες πορτοκάλι

Εφόσον το D-λιμονένιο βρίσκεται μόνο στο πορτοκαλί μέρος της φλούδας του πορτοκαλιού, για την αποδοτικότερη απόσταξή του πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός της φλούδας στο πορτοκαλί και το λευκό μέρος της, καθώς το τελευταίο θα λειτουργούσε παρεμποδιστικά στην παραλαβή του αιθέριου ελαίου. Ως δείγμα για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία επιλέχθηκαν οι φλούδες που προέκυψαν μετά την εκχύλιση των φαινολικών και αποτέλεσε το τελευταίο στάδιο της πειραματικής πορείας του βιοδιυλιστηρίου για το πορτοκάλι.

Εικόνα 2. 11 Διαχωρισμός της φλούδας πορτοκαλιού στο λευκό και το πορτοκαλί τμήμα

Η μέθοδος με την οποία έγινε η παραλαβή του λιμονένιου ήταν αυτή της απόσταξης και συγκεκριμένα της υδροατμοαπόσταξης. Σύμφωνα με αυτή, το αιθέριο έλαιο αποστάχθηκε μέσω των ατμών του νερού, χωρίς το δείγμα να ερχόταν σε επαφή με το νερό, καθώς κάτι τέτοιο θα ελάττωνε την απόδοσή του. Κατά την απόσταξη, η διάρκεια της οποίας ήταν μισή ώρα, νερό και λιμονένιο έζεαν στους 98 ^{o}C, ενώ οι παραγόμενοι ατμοί, οι οποίοι περιείχαν το αιθέριο έλαιο, συμπυκνώθηκαν και συλλέχθηκαν στη διαχωριστική χοάνη, ήταν ένα είδος γαλακτώματος νερού και αιθέριου ελαίου. (Hidro, 2013, Thompson, 2018)

Εικόνα 2. 12 Διάταξη απόσταξης D – λιμονένιου

Η προσθήκη ποσότητας πετρελαϊκού αιθέρα στο απόσταγμα ήταν καταλυτική στο να διασπαστούν αυτού του είδους τα γαλακτώματα και να διαχωριστεί η υδατική από την οργανική φάση. Στη συνέχεια, συλλέχθηκε η οργανική φάση, η οποία πέρα από τον οργανικό διαλύτη, περιείχε και το D-λιμονένιο, ενώ η υδατική απορρίφθηκε. Τέλος, ο πετρελαϊκός αιθέρας εξατμίστηκε μέσω περιστροφικού εξατμιστήρα, λαμβάνοντας επιτυχώς μόνο το καθαρό και άχρωμο D-λιμονένιο. Το ποσοστό της επιτυχούς παραλαβής του αιθέριου ελαίου υπολογίστηκε από το βάρος του λιμονένιου μετά το πέρας της απόσταξης διαιρεμένο με το αρχικό βάρος της φλούδας που χρησιμοποιήθηκε και πολλαπλασιασμένο επί 100, δηλαδή % αιθέριου ελαίου = $\frac{\text{Βάρος λιμονένιου } (g)}{\text{Βάρος αρχικής φλούδας } (g)} * 100$.

Εικόνα 2. 13 D-Λιμονένιο

2.3 Ζυμώσεις

2.3.1 Υγρές καλλιέργειες (Submerged fermentations, SmF)

2.3.1.1 Εμπορικά υποστρώματα-Czapek-dox broth, TSB broth, YMB

Σε αυτές τις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά εμπορικά υποστρώματα, το Czapek broth (*Czapek-dox modified broth*, 30,0 g γλυκόζη, 3,0 g νιτρικό νάτριο-$NaNO_3$, 1,0 g θειικό κάλιο-K_2SO_4, 0,5 g γλυκεροφωσφορικό μαγνήσιο-$C_3H_7MgO_6P$ και 0,01 g δισθενής θειικός σίδηρος-$FeSO_4$ (II)), το TSB (*Trypticasein Soy Broth*, 17,0 g υδρόλυμα καζεΐνης, 5,0 g χλωριούχο νάτριο-NaCl, 3,0 g υδρόλυμα σόγιας, 2,5 g όξινο φωσφορικό κάλιο-K_2HPO_4 και 2,5 g γλυκόζη) και το YMB. Σε κωνικές φιάλες των 250 mL, προστέθηκε καθένα από τα εμπορικά υποστρώματα και τα οποία διαλύθηκαν σε νερό, σε τελικό όγκο 50 mL. Το κάθε εμπορικό υπόστρωμα παρασκευάστηκε με διαφορετική συγκέντρωση και σύμφωνη με τις οδηγίες που προβλέπονταν για το καθένα χωριστά. Η συγκέντρωση για το Czapek broth ήταν στα 35 g/L, για το TSB στα 30 g/L, ενώ όσον αφορά στο YMB, εκείνο χρειάστηκε να παρασκευαστεί. Συγκεκριμένα, 10 g γλυκόζης, 5 g πεπτόνης, 3 g εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) και 3 g εκχυλίσματος βύνης (malt extract) σε τελικό όγκο 1 L νερού διαμόρφωσαν το εμπορικό υπόστρωμα του YMB.

Για τον εμβολιασμό, χρησιμοποιήθηκε μια στερεή προκαλλιέργεια, στην οποία είχε αναπτυχθεί ο μύκητας *Penicillium purpurogenum* και ο οποίος με την προσθήκη διαλύματος Tween 80 (Πολυσορβικό 80-$C_{64}H_{124}O_{26}$) απομονώθηκε από το στερεό υπόστρωμα, δημιουργώντας ένα εναιώρημα.

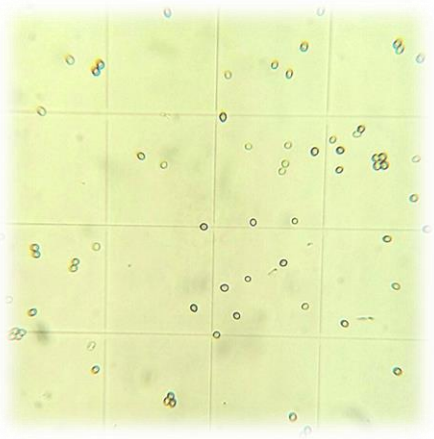
Εικόνα 2. 14 Στερεή προκαλλιέργεια Czapek broth, με ανεπτυγμένο τον μύκητα Penicillium purpurogenum

Εικόνα 2. 15 Εναιώρημα του μύκητα Penicillium purpurogenum, μετά την προσθήκη του διαλύματος Tween 80

Με τη βοήθεια του οπτικού μικροσκοπίου, μετρήθηκαν σε πλάκα αιματοκυτταρόμετρου Thoma τα σπόρια του μύκητα, βάσει των οποίων εμβολιάστηκαν, με την απαιτούμενη ποσότητα μικροοργανισμού, οι υγρές καλλιέργειες. Η πλάκα περιέχει δύο πλέγματα μέτρησης των κυττάρων, τα οποία πλέγματα διαιρούνται σε 9 μεγάλα τετράγωνα. Αυτά τα τετράγωνα υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα τετράγωνα και τα οποία αποτελούν το γνώμονα για τη μέτρηση του πληθυσμού των σπορίων. Το κάθε τετράγωνο μιας δεκαεξάδες έχει εμβαδό 0,0025 mm^2 και ύψος 0,1 mm. Η πράξη πίσω από την εύρεση των σπορίων του κάθε μικρού τετραγώνου ανά μl περιλαμβάνει το πηλίκο του αριθμού των σπορίων του τετραγώνου διαιρεμένο με το γινόμενο του εμβαδού και του βάθους, όπως αυτά αναφέρθηκαν παραπάνω, δηλαδή:

Αριθμός σπορίων/μl = $\frac{\text{Αριθμός σπορίων ανά τετράγωνο}}{(0{,}0025\ mm2 * 0.1\ mm)}$. Ο προκύπτων αυτός αριθμός των σπορίων πολλαπλασιασμένος με το 1000, δίνει τον αριθμό των σπορίων ανά mL. (Nabi, 2017) Μετά τον υπολογισμό των σπορίων σε ορισμένες από τις δεκαεξάδες τετραγώνων, βρέθηκε ο μέσος όρος των σπορίων ανά mL και με τη βοήθεια του νόμου της αραίωσης, προσδιορίστηκε ο όγκος του εναιωρήματος μύκητα που προστέθηκε στην εκάστοτε κωνική φιάλη, έτσι ώστε ο τελικός αριθμός των σπορίων, στον όγκο των 50 mL, να είναι 10^6 σπόρια/mL.

Εικόνα 2. 16 Πλάκα αιματοκυτταρόμετρου Thoma



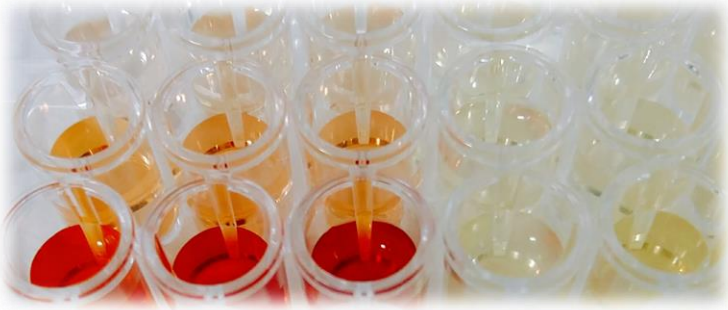
Εικόνα 2. 17 Δεκαεξάδα τετραγώνων, της πλάκας αιματοκυτταρόμετρου Thoma

Κατόπιν του εμβολιασμού, οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν για επώαση σε υπό ανάδευση επωαστήρα (Zhicheng, ZHWY – 211C, Incubator shaker) στους 28 ºC και ρυθμισμένο στις 220 στροφές (rpm)/min. Η επώαση και κατ' επέκταση η παραγωγή εξωκυτταρικής κόκκινης χρωστικής διήρκησε 12 ημέρες.

Εικόνα 2. 18 Εμβολιασμός μύκητα στις υγρές καλλιέργειες των εμπορικών υποστρωμάτων, Czapek broth, TSB, YMB, μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής (Telstar Bio II Advance, Biological safety cabinet, Laminar flow)

Εικόνα 2. 19 Υγρές καλλιέργειες με τα εμπορικά υποστρώματα Czapek broth, TSB και YMB

Σε όλη τη διάρκεια της επώασης συλλέγονταν δείγματα από όλες τις υγρές καλλιέργειες ανά δύο ημέρες. Τα δείγματα όπου το υπόστρωμα ήταν το Czapek broth αναλύθηκαν μέσω HPLC για τον προσδιορισμό της επιτυχούς κατανάλωσης των σακχάρων από το μύκητα, ενώ σε όλα μετρήθηκε και η απορρόφηση της χρωστικής, στο φάσμα του ορατού, στα 400, 470 και 500 nm, για το κίτρινο, πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα, με τη βοήθεια μικροπλακιδίου (PerkinElmer, Microplate), σε αυτόματη συσκευή ανάγνωσης (Tecan, Infinite 200 PRO).



Εικόνα 2. 20 Microplate για μέτρηση απορρόφησης της χρωστικής, στα 400, 470 και 500 nm

2.3.1.2 Εμπορικά σάκχαρα – σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη και διάλυμα αλάτων

Η συνέχεια των ζυμώσεων ήταν υγρές καλλιέργειες, οι οποίες αποτελούνταν από εμπορικά σάκχαρα-σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, καθώς ακόμα και από ένα διάλυμα αλάτων. Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε σύμφωνα με τα συστατικά που απαρτίζουν το εμπορικό υπόστρωμα Czapek broth. Η συγκέντρωση του κάθε

άλατος σε 1 L νερού ήταν 2 g νιτρικού νατρίου ($NaNO_3$), 1 g δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4), 0,5 g θειικού μαγνησίου ($MgSO_4$), 0,5 g χλωριούχου καλίου (KCl) και 0,01 g θειικού σιδήρου (III) ($Fe_2(SO_4)_3$), ενώ η συγκέντρωση της περιεχόμενης στο Czapek broth, σακχαρόζης, ήταν στα 30 g/L. Αφού παρασκευάστηκε το διάλυμα των αλάτων, το pH αυτού ρυθμίστηκε στην τιμή 7,3, με τη χρήση διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCl), συγκέντρωσης 7 % v/v. Πέρα από το διάλυμα των αλάτων, το οποίο λειτούργησε στο μύκητα ως πηγή αζώτου (N), εξίσου απαραίτητη ήταν και η πηγή άνθρακα (C) για την επιτυχή ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά διαλύματα σακχάρων, συγκέντρωσης 30 g/L το καθένα. Η επιλογή αυτών των σακχάρων πραγματοποιήθηκε βάσει του γεγονότος ότι η σακχαρόζη, η γλυκόζη και η φρουκτόζη αποτελούν και τα κυριότερα σάκχαρα που περιλαμβάνονται στο μήλο. Όπως ακριβώς και στις ζυμώσεις με τα εμπορικά υποστρώματα, έτσι και στις προκείμενες, με τη χρήση διαλύματος Tween 80, το οποίο προστέθηκε σε μια στερεή προκαλλιέργεια, δημιουργήθηκε ένα εναιώρημα του μικροοργανισμού. Από αυτό, ποσότητα 100 μl εναιωρήματος ήταν επαρκής για τη μέτρηση των σπορίων σε πλάκα αιματοκυτταρόμετρου και κατ' επέκταση για τον υπολογισμό των σπορίων ανά mL. Έχοντας ως στόχο τα 10^6 σπόρια/mL στον τελικό όγκο των 50 mL της κάθε υγρής καλλιέργειας, υπολογίστηκε ο όγκος του εναιωρήματος μύκητα που προστέθηκε.

Μετά την ολοκλήρωση των προαναφερθέντων, σε κωνικές φιάλες των 250 mL προστέθηκαν 5 mL από το διάλυμα των αλάτων, 20 mL εναιωρήματος μύκητα, ενώ ο υπόλοιπος, μέχρι τα 50 mL, όγκος συμπληρώθηκε με το εκάστοτε διάλυμα σακχάρου. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν στον υπό ανάδευση επωαστήρα, θερμοκρασίας 28 ^oC και 220 στροφών (rpm)/min, μέχρι ανάπτυξης του μικροοργανισμού και παραγωγής της χρωστικής-στόχου. Η επώαση διήρκησε 11 ημέρες, ενώ κάθε μέρα πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες ανά 24 ώρες, από την κάθε κωνική φιάλη. Στα συλλεχθέντα δείγματα, μετρήσεις όπως ο προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου, η συγκέντρωση των σακχάρων μέσω HPLC, η μέτρηση του pH, καθώς και η καταγραφή της απορρόφησης στα 400, 470 και 500 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis, ήταν ουσιαστικής σημασίας για μια ολοκληρωμένη εικόνα των συγκεκριμένων υγρών καλλιεργειών.

Μετά το πέρας των 11 ημερών και συνεπώς της ολοκλήρωσης της επώασης, η παραχθείσα βιομάζα και το υπερκείμενο από την κάθε κωνική φιάλη, συλλέχθηκαν

με σκοπό την εκχύλισης τόσο της ενδοκυτταρικής, όσο και της εξωκυτταρικής χρωστικής. Υπερκείμενο και βιομάζα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε φυγόκεντρο ρυθμισμένη στους 4 ^{o}C και τις 9000 στροφές (rpm)/min. Κατόπιν, ακολουθήθηκαν διαφορετικές πειραματικές πορείες για την εκχύλιση των χρωστικών. Η εξωκυτταρική χρωστική εκχυλίστηκε με τη βοήθεια του οργανικού διαλύτη οξικού αιθυλεστέρα ($CH_3COOCH_2CH_3$). (Arai et al., 2015) 0,5 mL από το κάθε υπερκείμενο αναδεύτηκε έντονα με 0,5 mL διαλύτη, αφέθηκε σε ηρεμία, μέχρι διαχωρισμού της οργανικής από την υδατική φάση και εκχύλιση της βιογενούς χρωστικής στο οργανικό στρώμα. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν οι οργανικές φάσεις και σε αυτές πραγματοποιήθηκε καταγραφή των τιμών απορρόφησης στα 400, 470 και 500 nm, για τη μέτρηση του χρώματος. Από την άλλη, όσον αφορά στη βιομάζα, εκείνη έλαβε μια διαφορετική επεξεργασία για την εκχύλιση της ενδοκυτταρικής χρωστικής και η οποία περιελάμβανε μια σειρά από εκπλύσεις της βιομάζας με αιθανόλη 70 %. Η αναλογία δείγματος-διαλύτη ήταν 1:20 w/v (βάρος ξηρού κατ' όγκο). Μετά την προσθήκη της αιθανόλης, τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο υπερήχων και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν, ενώ δείγμα του κάθε υπερκειμένου παραλαμβανόταν. Πραγματοποιήθηκαν επιπλέον τέσσερις εκπλύσεις με αιθανόλη και στα δείγματα μετρήθηκε το χρώμα στα 400, 470 και 500 nm.

Εικόνα 2. 21 Διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, για την εκχύλιση της ενδοκυτταρικής χρωστικής

2.3.1.3 Εμπορικά σάκχαρα – σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract solution) και ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution)

Τις ζυμώσεις με τα εμπορικά σάκχαρα και το διάλυμα αλάτων μόνο, διαδέχθηκαν οι υγρές καλλιέργειες, στις οποίες πέρα από σάκχαρα και άλατα, προστέθηκαν επίσης διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) και ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution). Το εκχύλισμα ζύμης παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 50 g/L. Από την άλλη για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος, χρησιμοποιήθηκαν το κιτρικό οξύ ($C_6H_8O_7$) και το άλας αυτού, κιτρικό νάτριο ($Na_3C_6H_5O_7$), σε συγκεντρώσεις 7,66 και 18,6-ένυδρων στερεών αντιδραστηρίων, g/L. Τα δύο επιπλέον διαλύματα προστέθηκαν για το λόγο ότι το μεν εκχύλισμα της ζύμης ήταν μια ακόμα πηγή αζώτου για το μικροοργανισμό, ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα είχε το ρόλο της διατήρησης του pH σε μια σταθερή τιμή. Και σε αυτή την περίπτωση τα σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν αυτά της σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης και σε συγκέντρωση 30 g/L, ενώ με τη χρήση της πλάκας αιματοκυτταρόμετρου, μετρήθηκε ο αριθμός των σπορίων, από το εναιώρημα, με διάλυμα Tween 80, μύκητα, με τα 10^6 σπόρια/mL να αποτελούν στόχο και σε αυτές τις καλλιέργειες.

Σε κωνικές φιάλες των 250 mL, προστέθηκαν 5 mL διάλυμα σακχάρου, 5 mL διάλυμα αλάτων, 5 mL διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης, 15 mL ρυθμιστικό διάλυμα και 3 mL από το εναιώρημα του μύκητα, ενώ ο υπόλοιπος, μέχρι τα 50 mL, όγκος συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα. Κατόπιν, οι φιάλες τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα υπό ανάδευση, στη θερμοκρασία των 28 ^oC και 220 στροφών (rpm)/min. Η διάρκεια της επώασης ήταν 13 ημέρες και σε όλη τη διάρκειά της συλλέγονταν δείγματα ανά 24 ώρες, στα οποία προσδιορίστηκε ο ανόργανος φώσφορος και το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων, μετρήθηκαν τα σάκχαρα και καταγράφηκε η απορρόφηση για το παραγόμενο χρώμα, στα 400, 470 και 500 nm. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα σε αυτές τις ζυμώσεις, δεν προσδιορίστηκε μέσω της HPLC, αλλά μέσω της μεθόδου DNS.

Από τη στιγμή που ο χρόνος επώασης έλαβε τέλος, σειρά είχαν οι εκχυλίσεις των ενδοκυτταρικών και των εξωκυτταρικών από τη βιομάζα και τα υπερκείμενα

αντίστοιχα, όπως ακριβώς περιγράφηκαν στις υγρές καλλιέργειες χωρίς το διάλυμα του εκχυλίσματος ζύμης και το ρυθμιστικό διάλυμα, με ορισμένες όμως διαφορές στη χρήση των οργανικών διαλυτών για την εκχύλιση της χρωστικής από τα υπερκείμενα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένας ακόμα οργανικός διαλύτης και σε διάφορες αναλογίες, προκειμένου να εκχυλιστεί επιτυχώς και ικανοποιητικά η εξωκυτταρική χρωστική. Η χρήση του οξικού αιθυλεστέρα δεν μεταβλήθηκε, διαφοροποιήθηκαν όμως οι αναλογίες στις οποίες προστέθηκε στο δείγμα του υπερκειμένου, σε σχέση με έναν άλλο οργανικό διαλύτη, αυτό της 2-προπανόλης. Η ποσότητα του υπερκειμένου για αυτές τις δοκιμές εκχύλισης της χρωστικής, επίσης δεν μεταβλήθηκε, παραμένοντας στο 0,5 mL. Οι αναλογίες οξικού αιθυλεστέρα:2-προπανόλης που έλαβαν χώρα, προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα, ήταν 5:5, 7,5:2,5, 2,5:7,5 και 1:9.

Επιπλέον, για σκοπούς βελτιστοποίησης των συνθηκών εκχύλισης της χρωστικής, πέρα από το συνδυασμό των διαλυτών του οξικού αιθυλεστέρα και της 2-προπανόλης, προστέθηκε στις αναλογίες 5:5 και 1:9, ποσότητα NaCl και τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο υπερήχων, με σκοπό την εκχύλιση της χρωστικής στην οργανική φάση. Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω προσπαθειών, οι απορροφήσεις για το κίτρινο, πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα καταγράφηκαν από φασματοφωτόμετρο UV-Vis στα μήκη κύματος των 400, 470 και 500 nm, αντίστοιχα. Από την άλλη μεριά, η ενδοκυτταρική χρωστική, προερχόμενη από τη βιομάζα, εκχυλίστηκε, όπως ακριβώς περιγράφηκε και στην περίπτωση των ζυμώσεων χωρίς το διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και το ρυθμιστικό διάλυμα. Μια σειρά εκπλύσεων της βιομάζας με EtOH 70 % και κατόπιν η μέτρηση του χρώματος των δειγμάτων συμπλήρωσαν επιτυχώς έναν κύκλο διεργασιών για την παραλαβή της ενδοκυτταρικής χρωστικής.

2.3.1.4 Διάφορες αναλογίες στην πηγή άνθρακα και αζώτου (C/N)

Με αυτές τις ζυμώσεις έκλεισε ο κύκλος βελτιστοποίησης των συνθηκών ανάπτυξης του *P.purpurogenum* και κατά συνέπεια παραγωγής της κόκκινης χρωστικής. Ειδικότερα, σκοπός των συγκεκριμένων ζυμώσεων ήταν ο έλεγχος της βέλτιστης ανάπτυξης του μύκητα και παραγωγή της χρωστικής, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αναλογίες πηγής άνθρακα και αζώτου. Και σε αυτή την περίπτωση τα σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν τα εμπορικά σάκχαρα της σακχαρόζης και της

γλυκόζης, σε συγκέντρωση 30 g/L. Επίσης το διάλυμα των αλάτων και το ρυθμιστικό διάλυμα παρέμειναν στις ίδιες συγκεντρώσεις, ενώ εκείνο το οποίο μεταβλήθηκε, ήταν η συγκέντρωση του διαλύματος εκχυλίσματος ζύμης. Οι αναλογίες C/N, στις οποίες επιλέχθηκαν να πραγματοποιηθούν αυτές υγρές καλλιέργειες, ήταν 5:1, 10:1, 20:1, 40:1, 60:1 και 80:1.

Για την ανάπτυξη του μύκητα, ως πηγή αζώτου δεν αποτέλεσε μόνο η παρουσία του εκχυλίσματος ζύμης και στο οποίο το συνολικό ποσοστό αζώτου έφτανε το 10,70 % [19] αλλά και το διάλυμα αλάτων και συγκεκριμένα το άλας του $NaNO_3$, το οποίο ήταν στη συγκέντρωση των 2 g/L. Βάσει υπολογισμών που πραγματοποιήθηκαν, βρέθηκε ότι το ποσοστό του αζώτου που περιλαμβανόταν στο $NaNO_3$, ήταν αυτό του 16,47 %. Όσον αφορά στην πηγή του άνθρακα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, αυτή προερχόταν αποκλειστικά από τα σάκχαρα της σακχαρόζης και της γλυκόζης και στα οποία το ποσοστό του άνθρακα που υπολογίστηκε, ήταν 42,07 και 39,98 %, αντίστοιχα. Με γνώμονα τα ποσοστά αυτά και τις συγκεντρώσεις των σακχάρων και του $NaNO_3$, υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ζύμης που αντιστοιχούσε στην καθεμιά αναλογία C/N. Σημειώνεται ότι στις αναλογίες του 40:1, 60:1 και 80:1, πέρα από τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος ζύμης, χρειάστηκε να μεταβληθεί και η συγκέντρωση του σακχάρου σε 50, 50 και 70 g/L, αντίστοιχα, καθώς οι υπολογισμοί με τα 30 g/L σάκχαρο, έδιναν αρνητικές τιμές για τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος της ζύμης. Συνεπώς, κατόπιν υπολογιστικών πράξεων, οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ζύμης που αντιστοιχούσαν στην κάθε αναλογία C/N, τόσο για τη σακχαρόζη, όσο και για τη γλυκόζη, συνοψίζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 2. 1 Συγκεντρώσεις διαλύματος εκχυλίσματος ζύμης και διαλύματος σακχαρόζης, για τις διάφορες αναλογίες C/N

Αναλογία C/N	Διάλυμα σακχαρόζης (g/L)	Διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης (g/L)
5:1	30	19,82
10:1	30	8,47
20:1	30	2,79
40:1	50	1,85
60:1	50	0,27
80:1	70	0,43

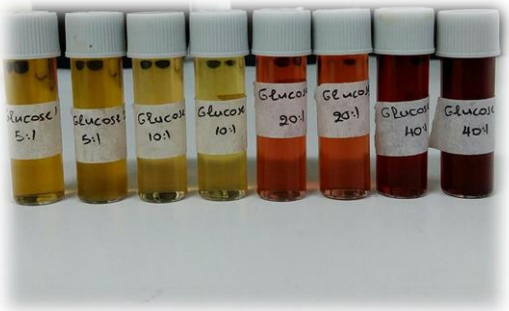
Πίνακας 2. 2 Συγκεντρώσεις διαλύματος εκχυλίσματος ζύμης και διαλύματος γλυκόζης, για τις διάφορες αναλογίες C/N

Αναλογία C/N	Διάλυμα γλυκόζης (g/L)	Διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης (g/L)
5:1	30	18,74
10:1	30	7,93
20:1	30	2,52
40:1	50	1,62
60:1	50	0,12
80:1	70	0,27

Μετά το τέλος των υπολογισμών, οι κωνικές φιάλες των 250 mL, οι οποίες περιείχαν το διάλυμα του σακχάρου, του εκχυλίσματος ζύμης, των αλάτων, του εναιωρήματος του μύκητα και το ρυθμιστικό διάλυμα, τοποθετήθηκαν στον υπό ανάδευση επωαστήρα, στη θερμοκρασία των 28 ^{o}C και ρυθμισμένο στις 220 στροφές (rpm)/min. Η ζύμωση είχε ολοκληρωθεί στις 7 ημέρες, ενώ καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης του πειράματος πραγματοποιούνται δειγματοληψίες ανά 12 ώρες. Στα δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου, του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, των σακχάρων-μέσω της μεθόδου DNS, μετρήθηκε επιπλέον η τιμή του pH, ενώ η μέτρηση του προκύπτοντος χρώματος από το κάθε δείγμα στα 400, 470 και 500 nm, αποτέλεσε μια

ακόμα καθοριστική καταγραφή αποτελεσμάτων, δίνοντας μία ξεκάθαρη εικόνα για τη συνολική πορεία της ζύμωσης.

Εικόνα 2. 22 Παραχθείσα εξωκυτταρική χρωστική, στις διάφορες αναλογίες C/N, με τη σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα



Εικόνα 2. 23 Παραχθείσα εξωκυτταρική χρωστική, στις διάφορες αναλογίες C/N, με τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα

Εικόνα 2. 24 Παραχθείσα βιομάζα, στην αναλογία C/N 80:1, με τη σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα

Εφόσον οι υγρές καλλιέργειες ολοκληρώθηκαν επιτυχώς, με την παρέλευση των 7 ημερών επώασης, η προκύπτουσα βιομάζα και το προκύπτον υπερκείμενο της κάθε αναλογίας αποτέλεσαν τα εναρκτήρια δείγματα της εκχύλισης των χρωστικών, τα οποία ακολούθησαν. Οι διαδικασίες εκχύλισης των εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών χρωστικών δεν παρέκκλιναν από τα όσα περιγράφηκαν στις προηγούμενες ζυμώσεις. Για τα υπερκείμενα χρησιμοποιήθηκε η αναλογία οξικού αιθυλεστέρα:2-προπανόλης 1:9. Και εν προκειμένω, καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis οι τιμές της απορρόφησης του κίτρινου, πορτοκαλί και κόκκινου χρώματος, στα 400, 470 και 500 nm, αντίστοιχα, επισφραγίζοντας την επιτυχία της εκχύλισης της χρωστικής στην οργανική φάση. Από την άλλη μεριά, όσον αφορά στην εκχύλιση της ενδοκυτταρικής χρωστικής από τη βιομάζα, η διεργασία που ακολουθήθηκε, ήταν η ίδια με τις προηγούμενες υγρές καλλιέργειες. Σειρά εκπλύσεων με EtOH 70 %, σε αναλογία 1:20 w/v (βάρος ξηρού κατ' όγκο) ήταν η πειραματική πορεία που έδωσε τα δείγματα, στα οποία έγινε η μέτρηση της απορρόφησης για την αποτελεσματικότητα της έντασης των παραγόμενων βιογενών χρωστικών.

2.3.1.5 Φυσικά σάκχαρα του μήλου, στην αναλογία C/N 20:1

Από τη στιγμή που οι υγρές καλλιέργειες για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης του μύκητα, έλαβαν τέλος επιτυχώς, ακλούθησαν οι ζυμώσεις στις οποίες ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν τα φυσικά σάκχαρα του μήλου (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη). Πιο συγκεκριμένα, η αναλογία C/N που επιλέχθηκε για τη διεξαγωγή των ζυμώσεων αυτών, ήταν αυτή του 20:1, κατά την οποία η συγκέντρωση του διαλύματος ζύμης ήταν 2,79 g/L, ενώ του διαλύματος σακχάρου 30 g/L. Ως δείγμα σακχάρου χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο της εκχύλισης των σακχάρων από τον πολτό του μήλο, με νερό και αραίωση 1:10 w/v. Αρχικά, μέσω της HPLC ελέγχθηκε η συγκέντρωση των σακχάρων σε σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, ενώ στη συνέχεια το υπερκείμενο συμπυκνώθηκε, μέσω του περιστροφικού εξατμιστήρα στην επιθυμητή συγκέντρωση. Οι κωνικές φιάλες των 250 mL, περιείχαν στον τελικό όγκο των 50 mL, το διάλυμα των σακχάρων, του εκχυλίσματος ζύμης, των αλάτων, του εναιωρήματος μύκητα, καθώς ακόμα και το ρυθμιστικό διάλυμα. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν στον υπό ανάδευση επωαστήρα, του οποίου η θερμοκρασία και οι στροφές ήταν ρυθμισμένα στους 28 ºC και τις 220

στροφές (rpm)/min, αντίστοιχα, ενώ η διάρκεια της επώασης ήταν 1 εβδομάδα. Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν ανά 24 ώρες, ενώ η κατανάλωση των σακχάρων ελέγχθηκε μέσω της HPLC.

Εικόνα 2. 25 Υγρές καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τα φυσικά σάκχαρα του μήλου, στην αναλογία C/N 20:1

2.3.2 Ζυμώσεις στερεάς κατάστασης (Solid State Fermentations, SSF)

2.3.2.1 Με φυσικά σάκχαρα του πορτοκαλιού

Σκοπός των ζυμώσεων αυτών ήταν η ανάπτυξη του *P.purpurogenum* σε στερεό υπόστρωμα, αποτελούμενο μόνο από φλούδες πορτοκαλιού και η παραγωγή της επιθυμητής χρωστικής. Ως πηγή άνθρακα για το μύκητα χρησιμοποιήθηκαν οι φλούδες πορτοκαλιού, οι οποίες είχαν προκύψει από την απόσταξη του λιμονένιου, καθώς και το λευκό μέρος της φλούδας μετά το διαχωρισμό των αντιοξειδωτικών συστατικών. Για την άρτια ανάπτυξη του μικροοργανισμού, τα δείγματα της φλούδας έλαβαν την ξηρή μορφή τους σε φούρνο θερμοκρασίας 88 ^{o}C και διάρκεια ξήρανσης 24 ώρες.

Στη συνέχεια, εφόσον το δείγμα είχε αφυγρανθεί, μοιράστηκε σε 10 κωνικές φιάλες των 250 mL. Κάθε κωνική φιάλη περιείχε 5 g ξηρού δείγματος φλούδας πορτοκαλιού. Κατόπιν, όπως πραγματοποιήθηκε και στις υγρές καλλιέργειες, ποσότητα διαλύματος Tween 80 προστέθηκε σε στερεή προκαλλιέργεια με ανεπτυγμένο το μύκητα, δημιουργώντας ένα εναιώρημα, τα σπόρια του οποίου μετρήθηκαν σε πλάκα αιματοκυτταρόμετρου. Και στην περίπτωση αυτή τα 10^6 σπόρια/mL ήταν ο στόχος για τον επιτυχή εμβολιασμό των δειγμάτων. Σημειώνεται

ότι η ποσότητα του εναιωρήματος μύκητα, καθώς επίσης και ο όγκος του νερού που προστέθηκαν στα δείγματα, ήταν τέτοια ώστε η υγρασία των στερεών καλλιεργειών να ήταν στο 65 %. Μετά την ολοκλήρωση του εμβολιασμού, οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα θερμοκρασίας 30 ^{o}C, μέχρι παραγωγής κόκκινης χρωστικής από το μύκητα.

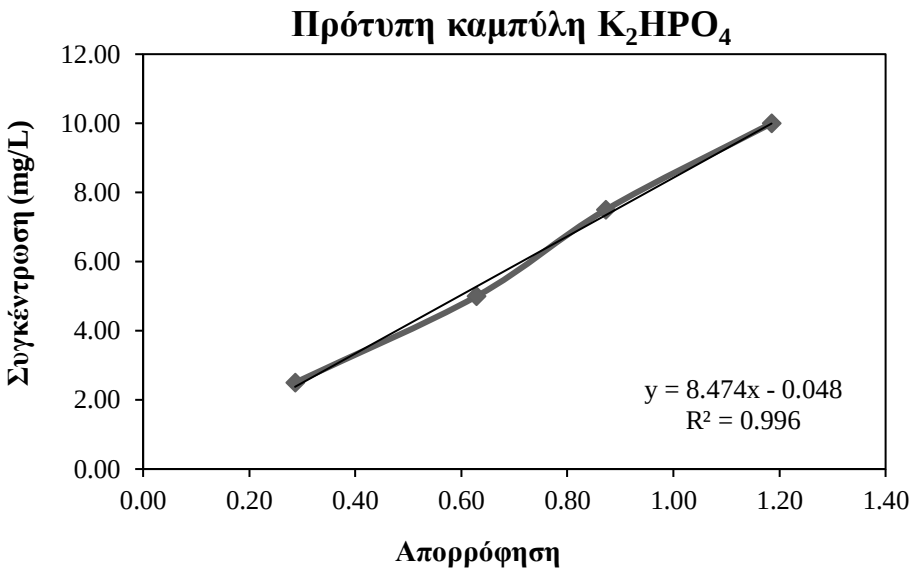
Εικόνα 2. 26 Στερεές καλλιέργειες, με υπόστρωμα τις φλούδες πορτοκαλιού. Αριστερά σε χρόνο t=0 και δεξιά μετά την παρέλευση 2 εβδομάδων, από τον εμβολιασμό

2.4 Αναλυτικές μέθοδοι

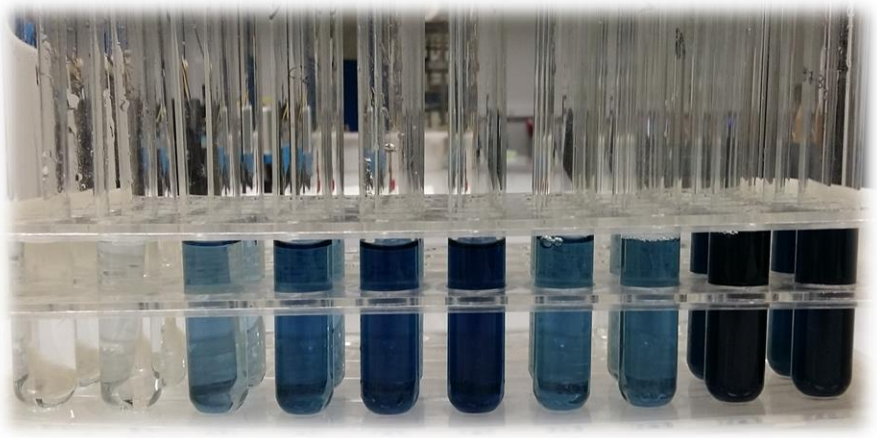
2.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (Inorganic phosphorus-IP)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης σε ανόργανο φώσφορο στηρίζεται στην περιεκτικότητα του φωσφόρου (P) στο πρότυπο διάλυμα του όξινου φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου, 5 mL (αραιωμένου) δείγματος αναδεύτηκαν (vortex) με 0,4 mL υπερχλωρικό οξύ ($HClO_4$) για 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, 0,3 mL διαλύματος ασκορβικού οξέος ($C_6H_8O_6$, 10 g/L) προστέθηκαν και αναδεύτηκαν με το δείγμα για ακόμα 10 δευτερόλεπτα. Έπειτα, 0,4 mL επταμολυβδαινικού αμμωνίου ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 50 g/L), προστέθηκαν στο δείγμα και αναδεύτηκαν με αυτό, για επιπλέον 10 δευτερόλεπτα. Τέλος, τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για 10 λεπτά και μετρήθηκαν οι απορροφήσεις τους σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Hitachi, U – 2000, Spectrophotometer), στα 730 nm. Για τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου, πέρα από τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν, παρασκευάστηκαν και πρότυπα δείγματα, βάσει των οποίων

κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς του K_2HPO_4 και η οποία συντέλεσε στην έκφραση των αποτελεσμάτων. Με συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/L K_2HPO_4 κατασκευάστηκε το γράφημα της πρότυπης καμπύλης και το οποίο φαίνεται παρακάτω. (Allen, 1940, Chen, 1956, Herbert et al., 1971)



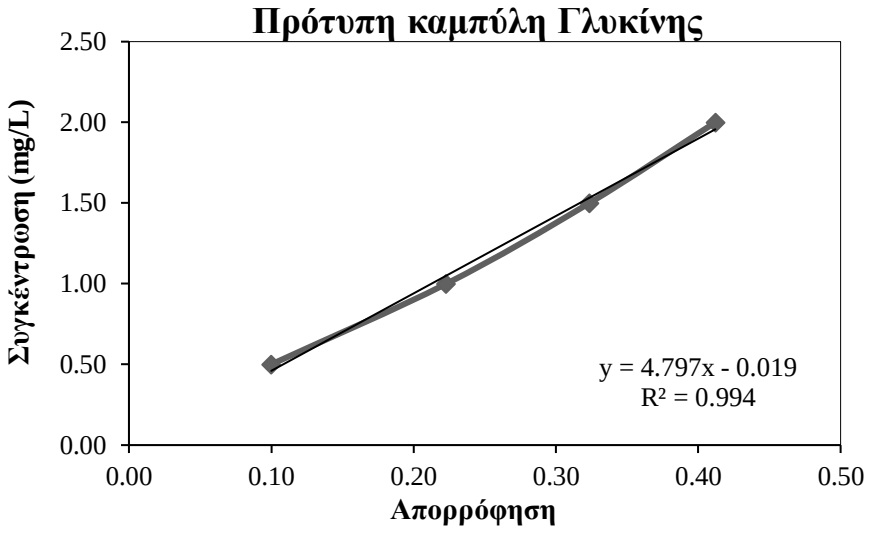
Γράφημα 2. 1 Πρότυπη καμπύλη K_2HPO_4, για τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου (IP)



Εικόνα 2. 27 Πρότυπα δείγματα K_2HPO_4, για τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου (IP), με συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/L (από αριστερά προς τα δεξιά)

2.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός αζώτου των ελευθέρων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen-FAN)

Σχετικά με τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, αυτός βασίζεται στη φωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης. Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης αυτής ήταν απαραίτητη η παρασκευή δύο διαλυμάτων, το αντιδραστήριο χρώσης (Color reagent) και το αντιδραστήριο αραίωσης (Dilution reagent). Ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 49.71 g/L), νινυδρίνη (5 g/L), φρουκτόζη (3 g/L) και δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4, ~40 g/L) ήταν τα συστατικά, τα οποία συνέθεσαν το αντιδραστήριο χρώσης. Ο λόγος της προσθήκης του KH_2PO_4 ήταν έτσι ώστε η τιμή του pH του διαλύματος να διαμορφωθεί στο 6,6-6,8. Για το αντιδραστήριο της αραίωσης, ιωδικό κάλιο (KIO_3, 2 g/L), αιθανόλη (EtOH 96 %, 384 mL) και απεσταγμένο νερό (~616 mL) αποτελέσαν τα κύρια συστατικά του διαλύματος αυτού. Το πρωτόκολλο, σύμφωνα με το οποίο προσδιορίστηκε το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων, περιελάμβανε 1 mL (αραιωμένου) δείγματος αναδευμένο με 0,5 mL από το διάλυμα της νινυδρίνης και θέρμανση στους 100 ^oC για 16 λεπτά. Κατόπιν, προκειμένου να διακοπεί η αντίδραση, τα δείγματα μεταφέρθηκαν για 20 λεπτά σε πάγο και στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτά 2,5 mL από το αντιδραστήριο της αραίωσης. Πριν από την ολοκλήρωση της μεθόδου ανάλυσης, τα δείγματα αναδεύτηκαν για 20 δευτερόλεπτα και τελικώς, μετρήθηκαν φωτομετρικά στα 540 nm. Επιπλέον, για την εύρεση του αζώτου των ελεύθερων αμινοξέων στα δείγματα, η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης της γλυκίνης κρίθηκε απαραίτητη για την έκφραση των αποτελεσμάτων. Στις συγκεντρώσεις του 0,5, 1, 1,5 και 2 mg/L παρασκευάστηκαν τα πρότυπα δείγματα, ενώ το προκύπτον γράφημα παρατίθεται παρακάτω. (Lie, 1973)



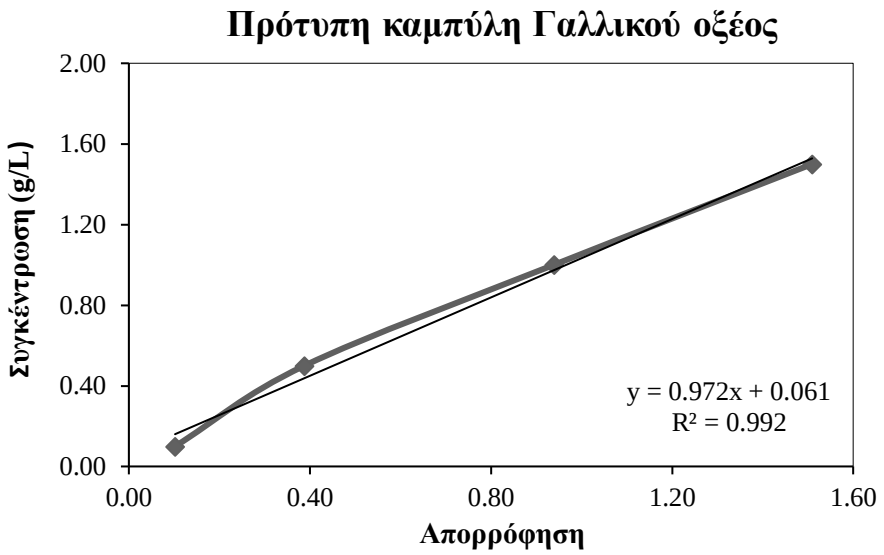
Γράφημα 2. 2 Πρότυπη καμπύλη γλυκίνης, για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινοξέων (FAN)

2.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ελεύθερων σακχάρων μέσω HPLC

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων πραγματοποιήθηκε μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC). Τα κυριότερα μέρη από τα οποία αποτελείται ένα χρωματογραφικό σύστημα HPLC είναι το σύστημα παροχής της κινητής φάσης-διαλύτης, η αντλία υψηλής πίεσης, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, η στήλη διαχωρισμού, ο ανιχνευτής και ο καταγραφέας-ολοκληρωτής. Η αρχή της υγρής χρωματογραφίας στηρίζεται στο χρόνο κατακράτησης (R_f), ο οποίος με τη σειρά του καθορίζεται από την αλληλεπίδραση των συστατικών του δείγματος με τη στατική φάση. (Χατζηϊωάννου, 2010) Ως κινητή φάση για αυτό, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα H_2SO_4 συγκέντρωσης 10 mM, με ροή 0,6 mL/min, ενώ η στήλη (στατική φάση) για το διαχωρισμό των συστατικών των δειγμάτων ήταν η Aminex HPX-87H, με διαστάσεις 300 mm x 7,8 mm και θερμοκρασία 65 ^oC. Για τους διαχωρισμούς των συστατικών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ισοκρατικής έκλουσης, καθώς δεν υπήρξε μεταβολή στη σύσταση και την πολικότητα του διαλύτη στις αναλύσεις των δειγμάτων, με το H_2SO_4 να αποτελεί τον αποκλειστικό διαλύτη.

2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών μέσω Folin-Ciocalteau (Total Phenolic Content)

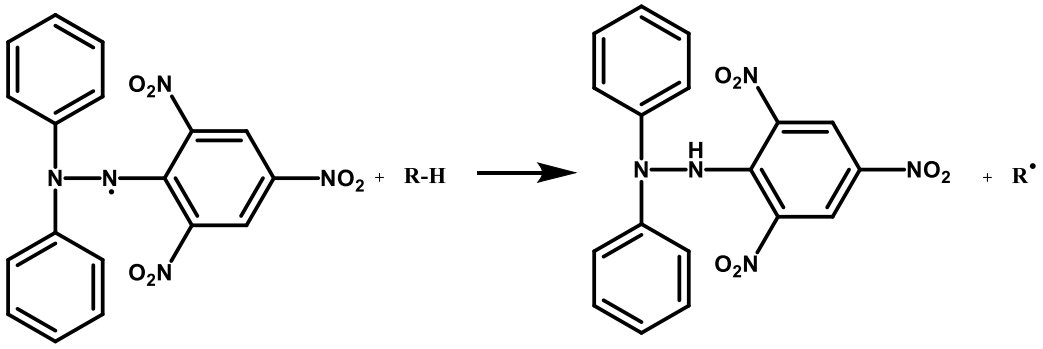
Η αρχή της μεθόδου του προσδιορισμού των ολικών φαινολικών συστατικών μέσω της Folin-Ciocalteau βασίζεται στην αλλαγή χρώματος με τη χρήση του αντιδραστηρίου Folin (Folin-Ciocalteau Reagent, FCR) και από το οποίο οι φαινολικές ενώσεις ανάγονται, παρουσία του ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις, 0,05 mL (αραιωμένου) δείγματος αναδεύτηκε για 5 λεπτά με 0,45 mL απιονισμένο νερό και 2,5 mL από το αντιδραστήριο Folin (0,2 N). Στη συνέχεια, 2 mL διαλύματος Na_2CO_3 (75 g/L) προστέθηκαν σε κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν για ανάδευση διάρκειας 1,5 ώρας σε επωαστήρα υπό ανάδευση (Zhicheng, ZHWY – 111C, Incubator shaker), ρυθμισμένο στη θερμοκρασία των 30 ^oC. Μετά το πέρας της 1,5 ώρας, καταγράφηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 765 nm και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με βάση την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (4 g/L). Έτσι, η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος κρίθηκε απαραίτητη για την έκφραση των αποτελεσμάτων, οι συγκεντρώσεις του οποίου ήταν στα 0,1, 0,5, 1, 1,5 και 2 g/L. Το γράφημα της πρότυπης καμπύλης φαίνεται παρακάτω. (Pinelo et al., 2004)



Γράφημα 2. 3 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος, για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Folin - Ciocalteau)

2.4.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH Radical Scavenging Method)

Όσον αφορά στη φωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας, αυτή στηρίζεται στην αναγωγή (δέσμευση) της ελεύθερης σταθερής ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) από τις αντιοξειδωτικές ουσίες RH· των τροφίμων στην 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζίνη, καθώς ακόμα και στο βαθμό αποχρωματισμού του διαλύματος που μετράται στα 517 nm. Ο αποχρωματισμός που παρατηρείται, είναι ανάλογος του βαθμού αναγωγής ή διαφορετικά της αντιοξειδωτικής ικανότητας του δείγματος. (Blois, 1958) Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, 3,9 mL διαλύματος DPPH (0,00316 g/100 mL μεθανόλης) προστέθηκαν σε 0,1 mL δείγματος (αραιωμένου και πυκνού). Στη συνέχεια, τα δείγματα αφέθηκαν στο σκοτάδι για 1,5 ώρα και τέλος, με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου UV-Vis, μετρήθηκαν οι απορροφήσεις αυτών στα 517 nm. (Brand-Williams et al., 1995)

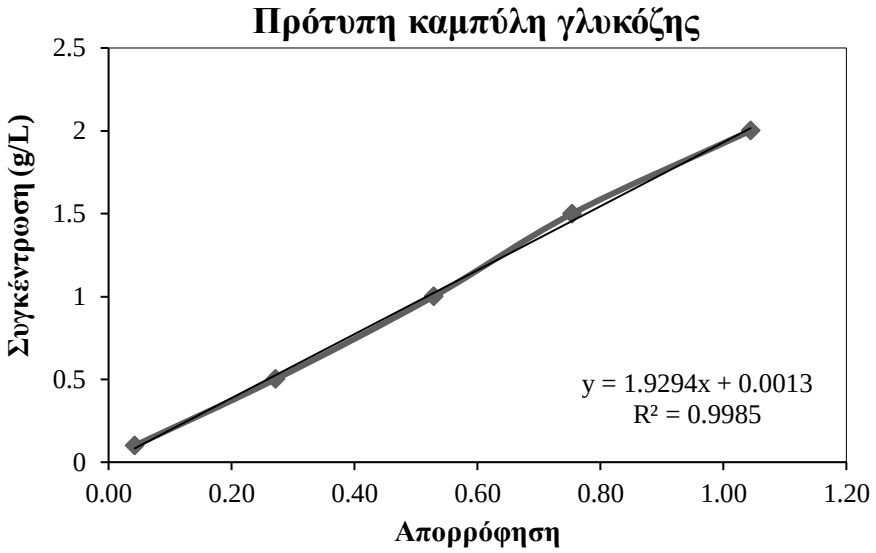


Εικόνα 2.28 Μηχανισμός δράσης του DPPH (Liang et al., 2014)

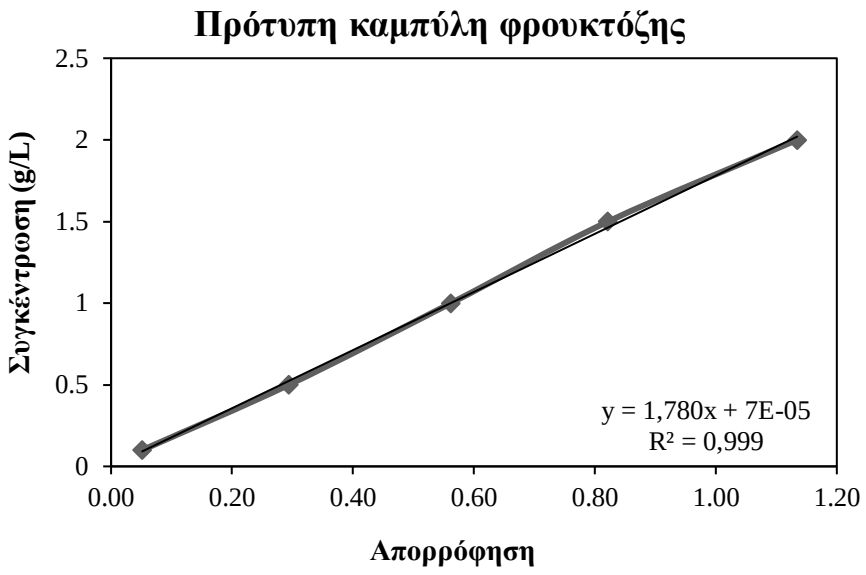
2.4.6 Ποσοτικός προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ, παρουσία NaOH και στην ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ. Το πρωτόκολλο της μεθόδου του δινιτροσαλικυλικού οξέος ή διαφορετικά DNS ($C_7H_4N_2O_7$) ακολουθήθηκε απευθείας για τα δείγματα της γλυκόζη και της φρουκτόζης, δεν ίσχυσε όμως το ίδιο και για την περίπτωση της σακχαρόζης. Καθώς η σακχαρόζη δεν αποτελεί ανάγον σάκχαρο, απαιτήθηκε η όξινη υδρόλυσή της με τη χρήση

διαλύματος HCl (2 M) και βρασμό μισής ώρας. Εφόσον το σάκχαρο υδρολύθηκε στα επιμέρους α-γλυκόζη και β-φρουκτόζη, η διαδικασία της μεθόδου DNS εφαρμόστηκε κανονικά, ενώ η καμπύλη αναφοράς μέσω της οποίας εκφράστηκαν τα αποτελέσματα, ήταν αυτή της γλυκόζης. Μετά και την υδρόλυση της σακχαρόζης και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της αναλυτικής μεθόδου, 0,5 mL αραιωμένου δείγματος αναδεύτηκε (vortex) με 0,5 mL διάλυμα DNS και τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 100 ^{o}C για 5 λεπτά. Έπειτα μεταφέρθηκαν σε πάγο, προκειμένου να διακοπεί η αντίδραση και στη συνέχεια προστέθηκαν στο κάθε δείγμα 5 mL απιονισμένο νερό. Κατόπιν ανάδευσης, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm. Με συγκεντρώσεις 2, 1,5, 1, 0,5 και 0,1 g/L κατασκευάστηκαν το γραφήματα της πρότυπης καμπύλης της γλυκόζης και της φρουκτόζης, για την έκφραση των αποτελεσμάτων και τα οποία φαίνονται παρακάτω. (Miller, 1959)



Γράφημα 2. 4 Πρότυπη καμπύλη της γλυκόζης, για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων, μέσω της μεθόδου DNS



Γράφημα 2. 5 Πρότυπη καμπύλη της φρουκτόζης, για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων, μέσω της μεθόδου DNS

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Αποτελέσματα σύστασης των, υπό μελέτη, φρούτων

3.1.1 Μήλο

Η υγρασία του μήλου βρέθηκε στο ποσοστό του 80,76 %, ενώ με βάση τον πρωτεϊνικό προσδιορισμό της Kjeldhal οι πρωτεΐνες υπολογίστηκαν στο 1,50 % επί ξηρού. Επιπλέον, όσον αφορά στο ποσοστό λίπους στο μήλο, αυτό προσδιορίστηκε μόλις στο 0,55 %, ενώ το στερεό ανόργανο υπόλειμμα της τέφρας στο 1,74 % επί ξηρού.

Στο υπερκείμενο κλάσμα του πολτοποιημένου μήλου, η περιεκτικότητά του σε ανόργανο φώσφορο (IP) μετρήθηκε στα 3,04 mg/L, ενώ η ανάλυση προσδιορισμού του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) ήταν 2,14 mg/L. Ακόμα, ελεύθερα σάκχαρα ήταν η σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη σε συγκεντρώσεις 10,55, 31,18 και 86,58 g/L, αντίστοιχα. Το προκύπτον ίζημα του πολτού του μήλου, μετά τις διαδοχικές εκπλύσεις με νερό έδωσε 1,43, 6,65 και 16,98 g/L σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, αντίστοιχα κατά την 1^{η} έκπλυση, ενώ 0,84, 5,05 και 11,69 g/L, σε σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, αντίστοιχα επίσης, ήταν τα αποτελέσματα της HPLC για την 2^{η} κατά σειρά έκπλυση με νερό. Τέλος, το pH ήταν 4,44, ενώ 1,06 g/mL ήταν η τιμή στην οποία βρέθηκε η πυκνότητα του πολτού του μήλου. Στον πίνακα 3.1 που ακολουθεί, συνοψίζονται τα αποτελέσματα της σύστασης του μήλου, καθώς και αποτελέσματα άλλων ερευνητικών μελετών.

Πίνακας 3. 1 Αποτελέσματα σύστασης του μήλου

	Παρούσα μελέτη	**Άλλες μελέτες**
pH	4,44 ± *0,00*	3,87 ± *0,11* (Wu et al., 2007)
Υγρασία (%)	80,76 ± *0,49*	80,39 (Campeanu et al., 2009)
Πρωτεΐνες (% επί ξηρού)	1,50 ± *0,11*	1,56 ± *0,01* (Onivogui et al., 2014)
Λίπος (% επί ξηρού)	0,55	1,31 ± *0,11* (Onivogui et al., 2014)
Τέφρα (% επί ξηρού)	1,74 ± *0,07*	1,96 (Campeanu et al., 2009)
Πυκνότητα (g/mL)	1,06 ± *0,00*	1,05 (Ramos et al., 1998
IP (mg/L)	3,04 ± *0,01*	
FAN (mg/L)	2,14 ± *0,12*	
Ελεύθερα σάκχαρα (g/L)		
Σακχαρόζη	10,55 ± *0,31*	24,00±*0,7* (Wu et al., 2007)
Γλυκόζη	31,18 ± *0,89*	33,80±*0,4* (Wu et al., 2007)
Φρουκτόζη	62,43 ± *0,07*	53,90±*0,6* (Wu et al., 2007)
Μηλικό οξύ	13,25 ± *0,68*	-

Επιπρόσθετα, από τις εκχυλίσεις κατά Soxhlet με νερό και αιθανόλη, το βάρος των υδατοδιαλυτών εκχυλισμάτων βρέθηκε στα 149,65 g, ενώ συμπεριλαμβανομένου και του νερού που προστέθηκε σε αυτά, το συνολικό βάρος ανήλθε στα 202,07 g. Από τα 5 g ξηρού αρχικού δείγματος, τα 2,07 g αποτέλεσαν το βάρος των στερεών υδατοδιαλυτών εκχυλισμάτων. Από την άλλη, το βάρος των οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων, το οποίο προέκυψε μετά την εξάτμιση του διαλύτη της αιθανόλης, βρέθηκε στα 0,08 g. Οι αναλύσεις σε ανόργανο φώσφορο και άζωτο ελεύθερων αμινομάδων στα εκχυλίσματα του νερού κατέγραψαν τα αποτελέσματα των 227,70 και 122,23 mg/100 g ξηρού βάρους, αντίστοιχα. Στον πίνακα 3.2 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υδατοδιαλυτών και οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων των εκχυλίσεων κατά Soxhlet.

Πίνακας 3. 2 Αποτελέσματα υδατοδιαλυτών (IP, FAN σε mg/100 g ξηρού βάρους και σάκχαρα και μηλικό οξύ σε g/100 g ξηρού βάρους) και οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων, στις εκχυλίσεις κατά Soxhlet, στο μήλο

ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ	
Βάρος εκχυλισμάτων (g)	2,07
IP	227,70 ± *0,58*
FAN	122,23 ± *0,33*
Σακχαρόζη	1,55 ± *0,14*
Γλυκόζη	24,28 ± *0,27*
Φρουκτόζη	62,43 ± *0,07*
Μηλικό οξύ	13,25 ± *0,68*
ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΔΙΑΛΥΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ	
Βάρος εκχυλισμάτων (g)	0,08

3.1.2 Φλούδες πορτοκαλιού

Η υγρασία της φλούδας του πορτοκαλιού βρέθηκε στο ποσοστό του 66,80 %, ενώ βάσει του προσδιορισμό των πρωτεϊνών μέσω της Kjeldhal υπολογίστηκε στο 3,37 % επί ξηρού. Επιπλέον, όσον αφορά στο ποσοστό λίπους στο πορτοκάλι, αυτό προσδιορίστηκε στο 2,76 %, ενώ το στερεό ανόργανο υπόλειμμα της τέφρας στο 2,88 % επί ξηρού.

Στο υπερκείμενο κλάσμα της πολτοποιημένης φλούδας πορτοκαλιού, η περιεκτικότητά του σε ανόργανο φώσφορο (IP) μετρήθηκε στα 3,47 mg/L, ενώ η ανάλυση προσδιορισμού του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) ήταν 1,02 mg/L. Ακόμα, η σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη βρέθηκαν σε συγκεντρώσεις 2,60, 17,57 και 13,62 g/L, αντίστοιχα. Τέλος, το pH ήταν 4,45, ενώ στο 0,49 g/mL ήταν η τιμή στην οποία βρέθηκε η πυκνότητα του πολτού της φλούδας πορτοκαλιού. Στον πίνακα 3.3 που ακολουθεί, συνοψίζονται τα αποτελέσματα της σύστασης φλούδας του πορτοκαλιού, καθώς και αποτελέσματα άλλων μελετών, ενώ στον πίνακα 3.4 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υδατοδιαλυτών και οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων των εκχυλίσεων κατά Soxhlet.

Πίνακας 3. 3 Αποτελέσματα σύστασης της φλούδας πορτοκαλιού

	Παρούσα μελέτη	**Άλλες μελέτες**
pH	4,45 ± *0,05*	3,64 (Ángel Siles López et al., 2010)
Υγρασία (%)	66,80 ± *0,28*	76,01± *0,05* (M'hiri et al., 2015)
Πρωτεΐνες (% επί ξηρού)	3,37 ± *0,11*	4,00 (Al-Saadi et al., 2009)
Λίπος (% επί ξηρού)	2,76 ± *0,54*	1,95 (Ángel Siles López et al., 2010)
Τέφρα (% επί ξηρού)	2,88 ± *0,15*	3,50 (Ángel Siles López et al., 2010)
Πυκνότητα (g/mL)	0,49 ± *0,00*	1,05 (Ángel Siles López et al., 2010)
IP (mg/L)	3,47 ± *0,02*	-
FAN (mg/L)	1,02 ± *0,02*	-
Ελεύθερα σάκχαρα (g/L)		
Σακχαρόζη	2,60 ± *0,01*	-
Γλυκόζη	17,57 ± *0,08*	-
Φρουκτόζη	13,62 ± *0,09*	-

Πίνακας 3. 4 Αποτελέσματα υδατοδιαλυτών και οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων, στις εκχυλίσεις κατά Soxhlet, στις φλούδες πορτοκαλιού

ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ	
Βάρος εκχυλισμάτων (g)	1,27
IP	498,46 ± *1,37*
FAN	239,40 ± *0,53*
Σακχαρόζη	3,27 ± *0,22*
Γλυκόζη	51,00 ± *0,33*
Φρουκτόζη	65,88 ± *0,22*
ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΔΙΑΛΥΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ	
Βάρος εκχυλισμάτων (g)	0,14
Αντιοξειδωτική ικανότητα (AAI)	0,08
Ολικό φαινολικό περιεχόμενο	717,98 ± *0,00*

Τέλος, μέρος του ξηρού δείγματος (0,30 g) που παρέμεινε μετά τις εκχυλίσεις κατά Soxhlet με νερό και αιθανόλη, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της λιγνίνης, της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Το ποσοστό της λιγνίνης στο αρχικό ξηρό των 5,06 g βρέθηκε στο 1,79 % επί ξηρού, εκ των οποίων το 1,27 % αποτελεί την όξινη αδιάλυτη λιγνίνη, ενώ η όξινη διαλυτή λιγνίνη απαρτίζεται από το 0,51 %. Ολοκληρώνοντας, η περιεκτικότητα της φλούδας πορτοκαλιού σε κυτταρίνη, εκφρασμένη σε ποσοστό της β-γλυκάνης, βρέθηκε στο 32,02 %. Από την άλλη, το ποσοστό της ημικυτταρίνης υπολογίστηκε στο 48,36 %, από το άθροισμα των ποσοστών των επιμέρους μονομερών της ξυλάνης (15,29 %), της γαλακτάνης (7,38 %), της μαννάνης (14,79 %) και της αραβινάνης (10,90 %), από τα οποία και αποτελείται. Τα αποτελέσματα σε λιγνίνη, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, συνοψίζονται στον πίνακα 3.5 που ακολουθεί.

Πίνακας 3. 5 Αποτελέσματα σύστασης της φλούδας πορτοκαλιού, σε λιγνίνη, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	% επί ξηρού
Όξινο αδιάλυτο στερεό υπόλειμμα	3,77 ± *1,59*
Όξινη αδιάλυτη λιγνίνη	5,24 ± *3,02*
Όξινη διαλυτή λιγνίνη	0,70 ± *0,01*
Σύνολο λιγνίνης	5,94
Σύνολο λιγνίνης, μαζί με το % των εκχυλισμάτων H_2O / EtOH	1,79
Κυτταρίνη (εκφρασμένη σε β-γλυκάνη)	32,02
Ημικυτταρίνη (εκφρασμένη από το άθροισμα της ξυλάνης, γαλακτάνης, μαννάνης και αραβινάνης)	48,36

3.2 Αποτελέσματα βιοδιυλιστηρίου των, υπό μελέτη, φρούτων

3.2.1 Βιοδιυλιστήριο μήλου – Βελτιστοποίηση συνθηκών

Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών συστατικών από το ξηρό δείγμα του μήλου, με τη χρήση του επωαστήρα υπό ανάδευση δεν ήταν αμιγώς φαινολικές ενώσεις, αλλά συνεκχυλίστηκαν επιπλέον και τα ελεύθερα σάκχαρα του αποβλήτου. Η ανάλυση των υπερκειμένων, μετά την εκχύλιση, μέσω της HPLC, έδειξε υψηλή συγκέντρωση σε σάκχαρα και στις τρεις αναλογίες δείγματος-διαλύτη αιθανόλης και οξινισμένης αιθανόλης (1:20, 1:40, 1:80 w/v). Ο πίνακας 3.6 που ακολουθεί, παραθέτει τις συγκεντρώσεις των σακχάρων, όπως αυτά προέκυψαν από την HPLC.

Πίνακας 3. 6 Συγκεντρώσεις εκχυλιζόμενων σακχάρων (g/L), όπως προέκυψαν από την ανάλυση της HPLC, κατά την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών μέσω επωαστήρα υπό ανάδευση

Αραίωση (w/v)	Διαλύτης	Σακχαρόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Φρουκτόζη (g/L)
1:20	**EtOH**	1,74	8,65	18,15
	EtOH - HCl	1,87	8,55	17,06
1:40	**EtOH**	0,56	3,91	8,24
	EtOH - HCl	0,11	2,66	6,65
1:80	**EtOH**	0,69	2,04	4,26
	EtOH - HCl	0,66	2,02	4,24

Λόγω του ότι τα ελεύθερα σάκχαρα εκχυλίστηκαν μαζί με τα φαινολικά συστατικά, αποφασίστηκε η έκπλυση των πρώτων με διαλύτη το νερό. Συνεπώς, ο πολτός του μήλου αραιώθηκε στις αναλογίες του 1:10, 1:20 και 1:40 w/v και τα δείγματα μετά το πέρας του ξεπλύματος, αναλύθηκαν ως προς τα σάκχαρα, μέσω της HPLC. Στην αναλογία όπου παρατηρήθηκε η περισσότερη εκχύλιση των ελεύθερων σακχάρων, ήταν αυτή της 1:10, με το σύνολο της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης να φτάνει το 75,20 g/100 g ξηρού βάρους. Από την άλλη, στην αναλογία 1:20, η συγκέντρωση των σακχάρων που εκχυλίστηκε, υπολογίστηκε στα 71,78 g/100 g ξηρού βάρους, ενώ 69,50 g/100 g ξηρού βάρους ήταν η συγκέντρωση των σακχάρων στην 1:40 αραίωση. Εφόσον, ως βέλτιστη αναλογία εκχύλισης των σακχάρων επιλέχθηκε η 1:10, πραγματοποιήθηκε στο προκύπτον ίζημα αυτής της αναλογίας μια δεύτερη έκπλυση με νερό. Αυτό έγινε προκειμένου να διαπιστωθεί πως πράγματι τα ελεύθερα σάκχαρα είχαν εκχυλιστεί επιτυχώς. Στον πίνακα 3.7 που ακολουθεί, παρατίθενται τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των εκχυλιζόμενων σακχάρων, εκφρασμένα σε g/100 g ξηρού βάρους.

Πίνακας 3. 7 Συγκεντρώσεις σακχάρων (g/100 g ξηρού βάρους), κατά την έκπλυση του πολτού με νερό, στις διάφορες αναλογίες

Αραίωση (w/v)	**Σακχαρόζη (g/100 g ξ.β.)**	**Γλυκόζη (g/100 g ξ.β.)**	**Φρουκτόζη (g/100 g ξ.β.)**	**Σύνολο σακχάρων (g/100 g ξ.β.)**
1η Έκπλυση				
1:10	7,91 ± *0,05*	23,48 ±*0,44*	43,81 ± *0,31*	75,20
1:20	8,46 ± *1,13*	22,07 ± *0,16*	41,25 ± *0,35*	71,78
1:40	8,00 ± *0,17*	21,36 ± *0,11*	40,14 ± *0,14*	69,50
2η Έκπλυση				
1:10	0,03	0,08	1,61	

Στη συνέχεια του βιοδιυλιστηρίου, μέσω της ανάλυσης Folin-Ciocalteau προσδιορίστηκε ότι η περιεκτικότητα των φαινολικών που εκχυλίστηκαν από το ίζημα της έκπλυσης των σακχάρων με τη βοήθεια του υδατόλουτρου υπερήχων ήταν περισσότερη από εκείνη που εκχυλίστηκε με τη βοήθεια του υπό ανάδευση επωαστήρα. Συγκεκριμένα, μετά το πέρας των 2 ωρών κατά την εκχύλιση των αντιοξειδωτικών συστατικών με τον επωαστήρα υπό ανάδευση, τόσο οι διάφοροι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό, όσο και στις δύο αναλογίες που αυτοί που προστέθηκαν σε σχέση με το δείγμα, έδωσαν περιεκτικότητα σε φαινολικά σε συγκεντρώσεις με μικρή σχετικά απόκλιση μεταξύ τους. Οι συγκεντρώσεις αυτές, εκφρασμένες σε mg/100 g ξηρού βάρους, παρατίθενται στον πίνακα 3.8 που ακολουθεί.

Πίνακας 3. 8 Συγκεντρώσεις εκχυλιζόμενων φαινολικών συστατικών (mg/100 g ξηρού βάρους), με τη χρήση επωαστήρα υπό ανάδευση

Αραίωση (w/v)	Διαλύτες	TPC (mg/100 g ξ.β.)
1:20	**EtOH**	281,22
	EtOH – HCl	305,53
	MeOH	272,48
	MeOH – HCl	289,00
1:40	**EtOH**	434,13
	EtOH – HCl	474,96
	MeOH	445,80
	MeOH – HCl	486,63

Από την άλλη, η αναλογία στην οποία παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχύλισης των αντιοξειδωτικών συστατικών μέσω του υδατόλουτρο των υπερήχων, ήταν η 1:20 με το συνδυασμό των διαλυτών της αιθανόλης και της οξινισμένης αιθανόλης. Ειδικότερα, μετά το πέρας της μίας ώρας και κατόπιν της ανάλυσης Folin-Ciocalteau, η συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά για την προαναφερθείσα αναλογία ανήλθε στα 344,41 mg/100 g ξηρού βάρους, ενώ οι μικρότερες συγκεντρώσεις των εκχυλιζόμενων φαινολικών παρατηρήθηκαν τόσο στην αναλογία 1:10, όσο και στην 1:20, με τη χρήση του διαλύτη μεθανόλης. Στον πίνακα 3.9 που ακολουθεί, συνοψίζονται οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών, εκφρασμένες σε mg/100 g ξηρού βάρους, που καταγράφηκαν, τόσο για τις δύο αναλογίες, όσο και για τους τέσσερις διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 3. 9 Συγκεντρώσεις εκχυλιζόμενων φαινολικών συστατικών (mg/100 g ξηρού βάρους), με τη χρήση υδατόλουτρου υπερήχων

Αραίωση (w/v)	Διαλύτες	TPC (mg/100 g ξ.β.)
1:10	**EtOH**	297,12
	EtOH – HCl	318,02
	MeOH	268,44
	MeOH – HCl	314,62
1:20	**EtOH**	255,95
	EtOH – HCl	344,41
	MeOH	254,98
	MeOH – HCl	308,44

Ακόμα, εφόσον ως βέλτιστη αναλογία για την εκχύλιση των φαινολικών, επιλέχθηκε η 1:20 με διαλύτες την αιθανόλη και την οξινισμένη αιθανόλη, αρχικά με την εξάτμιση του διαλυτή προέκυψαν 0,94 g στερεών υπολειμμάτων, ενώ η προσθήκη 20 mL MeOH έδωσε τα μεθανολικά εκχυλίσματα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω του διαλύματος DPPH και η ολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, μέσω της Folin-Ciocalteau, έδωσε τις τιμές 0,01 AAI και 659,37 mg/100 g ξηρού βάρους, αντίστοιχα.

Τέλος, για την ολοκλήρωση του βιοδιυλιστηρίου του μήλου, από τα 57,40 g ιζήματος κατόπιν του διαχωρισμού των φαινολικών συστατικών, το βάρος των πηκτινών το οποίο εκχυλίστηκε, ήταν 0,51 g ξηρού βάρους. Από αυτό, τα 0,1 g ξηρού χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του βαθμού εστεροποίησης (% DE, Esterification degree) των πηκτινών και οποίος βρέθηκε στο 68,87 %. Το ποσοστό αυτό κατατάσσει τις πηκτίνες του μήλου στην κατηγορία του υψηλού βαθμού εστεροποίησης (>50 %). Αυτό συνεπάγεται το σχηματισμό πηκτών σε υδατοδιαλυτά διαλύματα, των οποίων η συγκέντρωση σε στερεά συστατικά (ιδιαίτερα σάκχαρα) είναι μεγαλύτερη από 55 % w/w, ενώ το pH τους κυμαίνεται στο 2,0 – 3,5.

3.2.2 Ισοζύγια μάζας μήλου

3.2.2.1 Εκχύλιση σακχάρων με H_2O, αραίωση 1:10 w/v

Σε 100 g πολτοποιημένου μήλου προστέθηκε νερό, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση. Μετά το πέρας της εκχύλισης των σακχάρων και της διήθησης του πολτού, το υπερκείμενο περιείχε σακχαρόζη 3,62 g/L, γλυκόζη 7,15 g/L, φρουκτόζη 14,13 g/L και μηλικό οξύ 17,37 g/L. Στον πίνακα 3.10 που ακολουθεί, παρατίθενται τα παραπάνω αποτελέσματα σακχάρων και μηλικού οξέος.

Πίνακας 3. 10 Συγκεντρώσεις σακχάρων και μηλικού οξέος σε g/L, 100 g/19,24 g ξηρού βάρους και ποσοστό (%) επί ξηρού, μετά την εκχύλιση των σακχάρων 1:10 w/v με H_2O

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	g/L	g/ 19,24 g ξηρού	% επί ξηρού
Σακχαρόζη	3,62	1,74	9,02
Γλυκόζη	7,15	3,43	17,81
Φρουκτόζη	14,13	6,77	35,20
Σύνολο σακχάρων	24,90	11,93	62,03
Μηλικό οξύ	17,37	8,33	43,27

Συνεπώς, από τα 19,24 g ξηρού τα 11,93 g αντιστοιχούν σε σάκχαρα, ενώ τα 8,33 g αποτελούν το μηλικό οξύ.

3.2.2.2 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών με EtOH – HCl, αραίωση 1:20 w/v

Το προκύπτον ίζημα της εκχύλισης των σακχάρων ήταν 3,52 g ξηρό βάρος. Για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών προστέθηκαν EtOH-HCl, ενώ μετά το πέρας της διεργασίας και της διήθησης του δείγματος, ο όγκος του υπερκειμένου βρέθηκε στα 315,00 mL. Το υπερκείμενο αυτό, κατόπιν εξατμίστηκε, αφήνοντας ένα στερεό υπόλειμμα βάρους 1,29 g. Σε αυτό το στερεό προστέθηκαν 20 mL MeOH και σε δείγμα αυτού προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών μέσω της Folin-Ciocalteau, δίνοντας το αποτέλεσμα των 273,30 mg/L. Η

συγκέντρωση αυτή των φαινολικών ανηγμένη στα 20 mL MeOH που προστέθηκαν, έδωσαν το αποτέλεσμα των 5,47 mg/0,02 L (ή 0,005 g/0,02 L), ενώ ανά γραμμάρια του στερεού υπολείμματος προσδιορίστηκε στα 423,40 mg/g στερεού εκχυλίσματος. Ο πίνακας 3.11 που ακολουθεί, συνοψίζει τα παραπάνω αποτελέσματα συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών.

Πίνακας 3. 11 Συγκεντρώσεις των μεθανολικών εκχυλισμάτων σε φαινολικά συστατικά, εκφρασμένα σε mg/L, mg/0,02 L MeOH και mg/g στερεού υπολείμματος

mg/L	**mg/0,02 L MeOH**	**mg/g στερεού εκχυλίσματος**
273,30	5,47	423,40

3.2.2.3 Εκχύλιση πηκτινών

Το ίζημα το οποίο παρέμεινε από την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών είχε βάρος 8,30 g. Από αυτά τα 2,96 g ήταν το βάρος των εκχυλιζόμενων πηκτινών και τα οποία μετά την ξήρανσή τους παρέμειναν στα 0,92 g ξηρού. Το στερεό υπόλειμμα, το οποίο παρέμεινε μετά την ολοκλήρωση όλου του βιοδιυλιστηρίου, είχε βάρος 20,66 g, από τα οποία τα 19,82 g ήταν νερό, ενώ τα 0,84 g αποτελούσαν το βάρος του ξηρού.

Συμπερασματικά, στα 19,24 g ξηρού περιλαμβάνονται 11,93 g σάκχαρα, 8,33 g μηλικό οξύ, 0,005 g φαινολικά συστατικά, 0,92 g πηκτίνες και 0,84 g απομένον στερεό υπόλειμμα.

3.2.3 Βιοδιυλιστήριο φλούδας πορτοκαλιού – Βελτιστοποίηση συνθηκών

Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών συστατικών από τη φλούδα του πορτοκαλιού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υδατόλουτρου υπερήχων και του συνδυασμού διαλυτών EtOH – HCl, σε αναλογία 1:25 w/v, διάρκειας 1 ώρας. Η ανάλυση του ολικού φαινολικού περιεχομένου του υπερκειμένου στις χρονικές στιγμές 0, 30 και 60 λεπτά, μέσω της Folin-Ciocalteau, έδωσε συγκεντρώσεις 322,37, 761,03 και 1.302,97 mg/100 g ξηρού βάρους, αντίστοιχα. Κατόπιν εξάτμισης του διαλύτη EtOH-HCl, το βάρος του απομένοντος στερεού υπολείμματος που

καταγράφηκε ήταν 4,94 g και στα οποία η προσθήκη 20 mL MeOH έδωσε τα μεθανολικά εκχυλίσματα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω του διαλύματος DPPH και η ολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, μέσω της Folin-Ciocalteau, έδωσε τις τιμές 0,02 AAI και 326,25 mg/100 g ξηρού βάρους, αντίστοιχα.

Το βιοδιυλιστήριο της φλούδας πορτοκαλιού ολοκληρώθηκε με την παραλαβή του αιθέριου ελαίου μέσω της υδροατμοαπόσταξης, μόνο από το πορτοκαλί τμήμα του δείγματος. Από αρχικό βάρος του πορτοκαλί μέρους ίσο με 108,42 g, το λιμονένιο το οποίο εκχυλίστηκε, σημείωσε βάρος 0,59 g, ενώ το ποσοστό απόδοσης της απόσταξής του βρέθηκε στο 0,54 %.

3.2.4 Ισοζύγια μάζας φλούδας πορτοκαλιού

3.2.4.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών με EtOH – HCl, αραίωση 1:25 w/v

Σε 100 g φλούδας πορτοκαλιού προστέθηκε νερό, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση. Το υπερκείμενο αυτό, κατόπιν εξατμίστηκε, αφήνοντας ένα στερεό υπόλειμμα βάρους 9,46 g. Σε αυτό το στερεό προστέθηκαν 20 mL MeOH και σε δείγμα αυτού προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών μέσω της Folin-Ciocalteau, δίνοντας το αποτέλεσμα των 750,60 mg/L. Η συγκέντρωση αυτή των φαινολικών ανηγμένη στα 20 mL MeOH που προστέθηκαν, έδωσαν το αποτέλεσμα των 15,01 mg/0,02 l (ή 0,015 g/0,02 l), ενώ ανά γραμμάρια του στερεού υπολείμματος προσδιορίστηκε στα 154,08 mg/g στερεού εκχυλίσματος. Ο πίνακας 3.12 που ακολουθεί, συνοψίζει τα παραπάνω αποτελέσματα συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών.

Πίνακας 3. 12 Συγκεντρώσεις των μεθανολικών εκχυλισμάτων σε φαινολικά συστατικά, εκφρασμένα σε mg/L, mg/0,02 L MeOH και mg/g στερεού υπολείμματος

mg / l	**mg/0,02 L MeOH**	**mg/g στερεού εκχυλίσματος**
750,60	15,01	154,08

3.2.4.2 Εκχύλιση D – λιμονένιου, με υδροατμοαπόσταξη

Το ίζημα το οποίο παρέμεινε από την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών, είχε βάρος 58,11 g. Αυτά, για την αποδοτικότερη παραλαβή του αιθέριου ελαίου, διαχωρίστηκαν στο λευκό και το πορτοκαλί τμήμα της φλούδας, με βάρη 17,47 και 40,64 g, αντίστοιχα. Από τα 40,64 g του πορτοκαλί μέρους της φλούδας, τα 32,89 g είναι νερό και τα 7,75 g αποτελούν το ξηρό, ενώ 0,39 ήταν τα γραμμάρια του λιμονένιου, που παρελήφθησαν. Το λευκό στερεό υπόλειμμα, το οποίο παρέμεινε μετά την ολοκλήρωση όλου του βιοδιυλιστηρίου, είχε βάρος 17,47 g, από τα οποία τα 10,84 g ήταν νερό, ενώ τα 6,63 g αποτελούσαν το βάρος του ξηρού. Από την άλλη, το πορτοκαλί μέρος της φλούδας το οποίο συλλέχθηκε μετά την εκχύλιση του αιθέριου ελαίου, είχε βάρος 48,79 g, με το νερό να αποτελεί τα 38,75 g, ενώ το ξηρό τα 10,03 g.

Συμπερασματικά, στα 33,20 g ξηρού περιλαμβάνονται 0,02 g φαινολικά συστατικά, 0,39 g λιμονένιο, καθώς επίσης 6,63 και 10,03 g απομένον στερεό υπόλειμμα, λευκού και πορτοκαλί τμήματος, αντίστοιχα.

3.2.5 Αξιοποίηση αποβλήτων φρούτων για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας μέσω της ανάπτυξης βιοδιυλιστηρίου

Η ανάγκη της αξιοποίησης των συσσωρευμένων αποβλήτων προς αποφυγή ζητημάτων ρύπανσης του περιβάλλοντος με επιπτώσεις στη χλωρίδα και την πανίδα, οδήγησε όχι στην αυτοτελή παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, αλλά σε μια ολιστική προσέγγιση. Με άλλα λόγια, κανένα προκύπτον κομμάτι δεν παρέμεινε ανεκμετάλλευτο από όλη τη διαδικασία του βιοδιυλιστηρίου των φρούτων, λαμβάνοντας από κάθε βήμα και από ένα προϊόν αξιοποιήσιμο από διαφορετικούς κλάδους (φαρμακευτική, κοσμητολογία, τρόφιμα).

Η μελέτη της σύστασης του μήλου και του πορτοκαλιού δεν παρουσίασε μεγάλες αποκλίσεις από τα αποτελέσματα άλλων ερευνών, συμβαδίζοντας έτσι με τη βιβλιογραφία (Al-Saadi et al., 2009, Ángel Siles López et al., 2010, Campeanu et al., 2009, M’hiri et al., 2015, Onivogui et al., 2014, Ramos, 1998, Wu et al., 2007) ενώ

αποτέλεσε σημαντικό βήμα για βαθύτερη κατανόηση και ορθότερη διεξαγωγή των βιοδιυλιστηρίων. Κατά την εξέλιξη των πειραμάτων για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης των φαινολικών συστατικών από το μήλο, η οξινισμένη αιθανόλη στην αναλογία 1:20 w/v και με τη χρήση υδατόλουτρου υπερήχων για 1 ώρα έδωσε συγκέντρωση ίση με 344,41 mg/100 g ξηρού βάρους. Αντίθετα, με το διαλύτη της αιθανόλης (70 %) μόνο, και στις ίδιες συνθήκες με παραπάνω, το αποτέλεσμα σε φαινολικά συστατικά διαμορφώθηκε στα 255,95 mg/100 g ξηρού βάρους, ενώ 114 mg/100 g ξηρού βάρους ήταν η ολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά που βρέθηκε από άλλη μελέτη και στην οποία η συγκέντρωση του διαλύτη της αιθανόλης ήταν 60 % v/v. Η προσθήκη του νερού για την επίτευξη της αναλογίας 1:20 w/v EtOH-HCl συντέλεσε στην επιτυχή παραλαβή των αντιοξειδωτικών συστατικών. Μερικές από τις φαινολικές ενώσεις προκύπτουν φυσικώς ως γλυκοζίτες, με αποτέλεσμα η παρουσία των σακχάρων αυτών να κάνει τα φαινολικά συστατικά περισσότερο υδατοδιαλυτά και συνεπώς να εκχυλίζονται ευκολότερα. Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι η χρήση υδατόλουτρου υπερήχων λειτούργησε περισσότερο αποτελεσματικά στην εκχύλιση των αντιοξειδωτικών, γεγονός που οφείλεται στην επίδραση των συχνοτήτων στο κυτταρικό τοίχωμα, αυξάνοντας την απόδοση του διαχωρισμού σε μικρότερο χρονικό διάστημα. (Dadwal et al., 2018) Πιο συγκεκριμένα, στην αναλογία 1:20 w/v και συνδυασμό διαλυτών EtOH-HCl, η συγκέντρωση των φαινολικών που εκχυλίστηκαν μέσω επωαστήρα υπό ανάδευση μετά το πέρας των δύο ωρών βρέθηκε στα 305,53 mg/100 g ξηρού βάρους, σε αντίθεση με το υδατόλουτρο υπερήχων, όπου μετά τη μία ώρα εκχύλισης, η συγκέντρωση ήταν στα 344,41 mg/100 g ξηρού βάρους. Επιπλέον, σύμφωνα με άλλες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, η χρήση του διαλύτη της μεθανόλης είναι περισσότερο συχνή για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Χρήση υδατόλουτρου υπερήχων για 15 λεπτά και αναλογία διαλύτη MeOH-H_2O 3:1 v/v σημείωσε συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικά ίση με 457,93-599,09 mg/100 g ξηρού βάρους. (Khan et al., 2010) Αν και η μεθανόλη επιδρά θετικά στην εκχύλιση των φαινολικών, λόγω της κατάλληλης πολικότητας που το μόριο διαθέτει, στην παρούσα διατριβή η χρήση της αιθανόλης κρίθηκε ορθότερη, λόγω του χαρακτηρισμού της ως ‘’πράσινο διαλύτη’’. Τέλος, όσον αφορά στο διαχωρισμό των φαινολικών συστατικών από το φλοιό πορτοκαλιού, μέσω του διαλύτη της οξινισμένης αιθανόλης στην αναλογία 1:25 w/v και τη χρήση του υδατόλουτρου υπερήχων για 30 λεπτά, η συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά βρέθηκε στα 761,03 mg/100 g ξηρού βάρους

και αρκετά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα 275 mg/100 g ξηρού βάρους που εκχυλίστηκαν στις ίδιες συνθήκες, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλλά με διαλύτη EtOH-H_2O 4:1. (Dadwal et al., 2018)

Στη συνέχεια του βιοδιυλιστηρίου του μήλου, η απόδοση της παραλαβής των πηκτινών σημειώθηκε στο 21,05 % (w/w), ποσοστό αρκετά κοντινό με εκείνο του 26,6 % (w/w) που βρέθηκε από τη βιβλιογραφία. (Garna et al., 2007) Η επιτυχής παραλαβή των πηκτινών επισφραγίστηκε με τον προσδιορισμό του βαθμό εστεροποίησης λαμβάνοντας το ποσοστό του 68,87 %, εν αντιθέσει με το 61 % άλλης ερευνητικής μελέτης. (Garna et al., 2007)

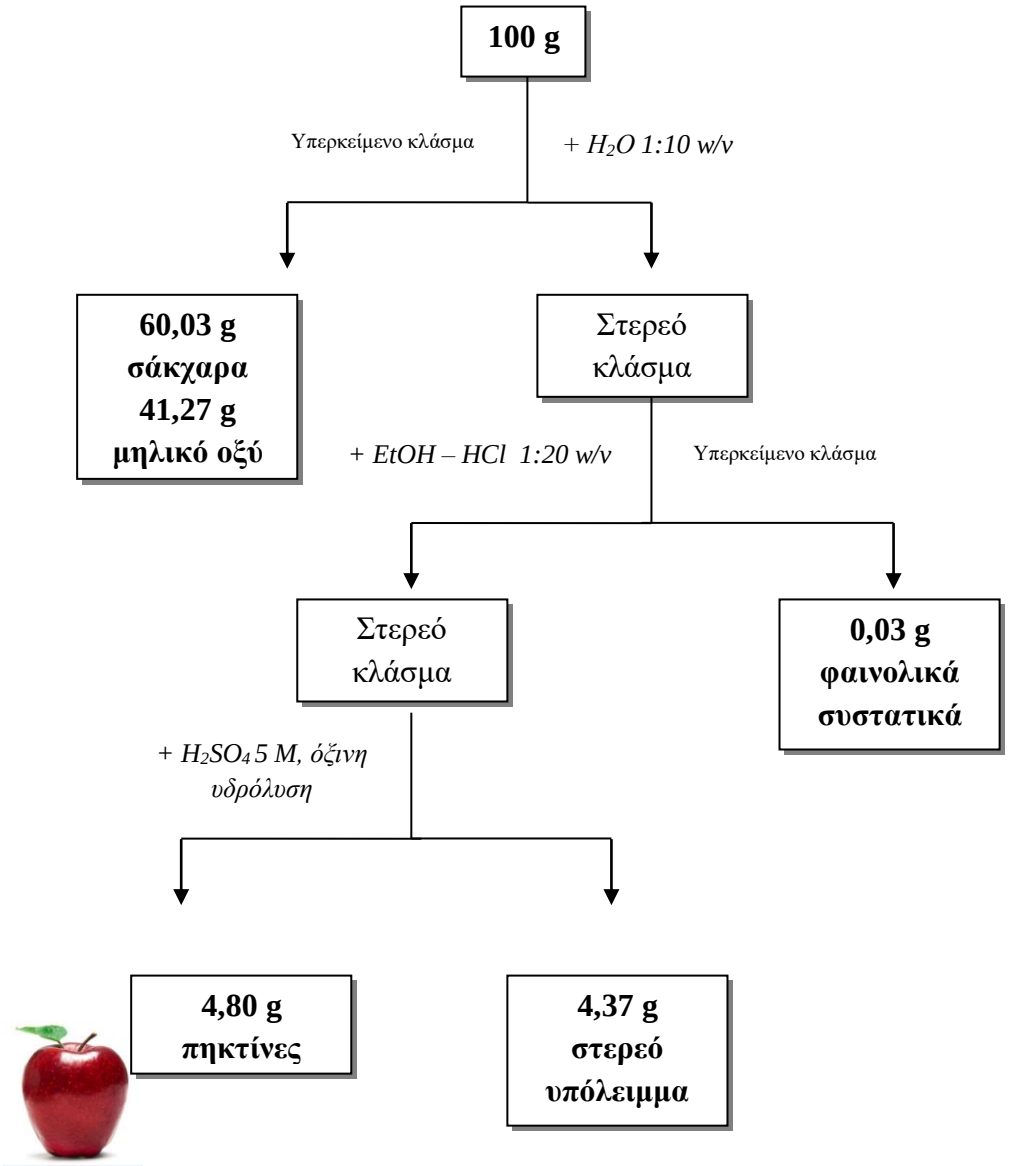
Από την άλλη μεριά, το βιοδιυλιστήριο για το φλοιό του πορτοκαλιού ολοκληρώθηκε με την παραλαβή του αιθέριου ελαίου, σημειώνοντας ποσοστό απόδοσης 0,95 %, τιμή συγκρίσιμη με εκείνη από τη βιβλιογραφία, η απόδοση του οποίου ήταν στο 0,98 %. (Alberti et al., 2014)

Τέλος, η διεξαγωγή των ισοζυγίων μάζας, αποτελώντας από τα πλέον ουσιαστικά μέρη της παρούσας ερευνητικής μελέτης, ήταν επιτυχής και για τα δύο φρούτα, με σχετικά μικρές τυπικές αποκλίσεις. Σκοπός ήταν η όσο το δυνατόν μικρότερη ή και καθόλου απώλεια μάζας κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του βιοδιυλιστηρίου. Με γνώμονα τα 100 g ξηρού βάρους για το μήλο και το φλοιό πορτοκαλιού, η τυπική απόκλιση βρέθηκε 10,25 και 17,86, αντίστοιχα. Φαίνεται ότι η μεγαλύτερη απώλεια σε μάζα πραγματοποιήθηκε κατά το βιοδιυλιστήριο του πορτοκαλιού. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται περισσότερο στο σημείο του διαχωρισμού του πορτοκαλί τμήματος του φλοιού από το υπόλοιπο λευκό μέρος, πριν από την εκχύλιση του D-λιμονένιου, γεγονός που ευνόησε την απώλεια μάζας. Τα αποτελέσματα των ισοζυγίων μάζας των βιοδιυλιστηρίων μήλου και φλούδας πορτοκαλιού συνοψίζονται στους πίνακες 3.13 και 3.14, ενώ οι εικόνες 3.1 και 3.2 αποτελούν τις διαγραμματικές απεικονίσεις των εν λόγω ισοζυγίων μάζας.

Πίνακας 3.13 Αποτελέσματα ισοζυγίου μάζας στο μήλο, εκφρασμένα σε g/19,24 g ξηρού βάρους και g/100 g ξηρού βάρους

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	**g/100 g ξηρού**
Σάκχαρα	60,03
Μηλικό οξύ	41,27
Φαινολικές ενώσεις	0,03
Πηκτίνες	4,80
Απομένον στερεό υπόλειμμα	4,37
Σύνολο	110,50
St.Dev	*7,42*

Στην εικόνα 3.1 που ακολουθεί παρακάτω, απεικονίζεται διαγραμματικά το ισοζύγιο μάζας για το μήλο, με γνώμονα το αρχικό ξηρό βάρος των 100 g.

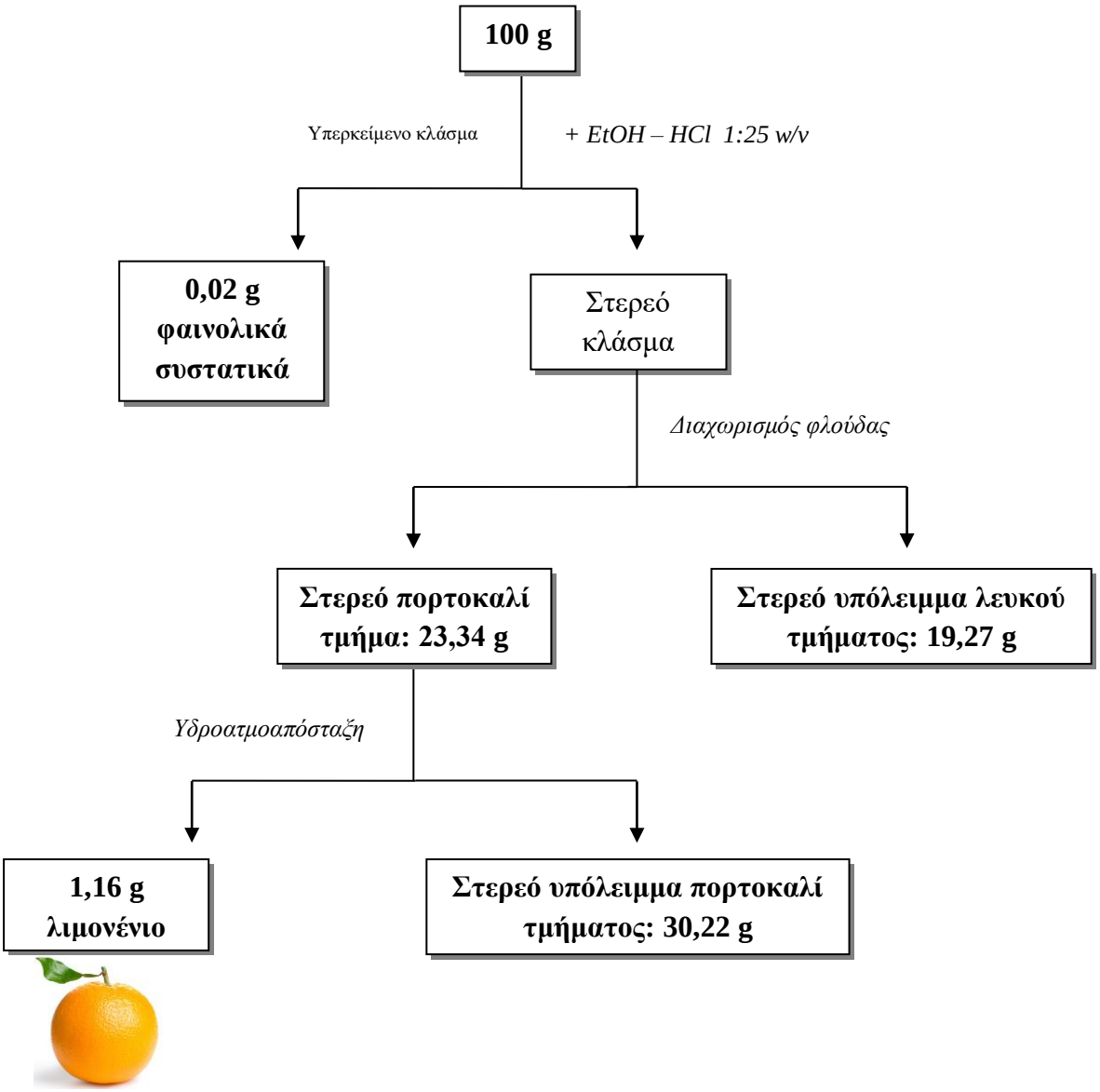


Εικόνα 3. 1 Διαγραμματική απεικόνιση ισοζυγίου μάζας στο μήλο, με 100 g αρχικό ξηρό βάρος

Πίνακας 3. 14 Αποτελέσματα ισοζυγίου μάζας στις φλούδες πορτοκάλι, εκφρασμένα σε g/33,20 g ξηρού βάρους και g/100 g ξηρού βάρους

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	**g/100 g ξηρού**
Φαινολικές ενώσεις	0,05
Πορτοκαλί τμήμα πριν από την εκχύλιση του λιμονένιου	23,34
D – Λιμονένιο	1,16
Απομένον λευκό στερεό υπόλειμμα	19,97
Απομένον πορτοκαλί στερεό υπόλειμμα	30,22
Σύνολο	74,74
St.Dev	*17,86*

Στην εικόνα 3.2 που ακολουθεί παρακάτω, απεικονίζεται διαγραμματικά το ισοζύγιο μάζας για τις φλούδες πορτοκαλιού, με γνώμονα το αρχικό ξηρό βάρος των 100 g.



Εικόνα 3. 2 Διαγραμματική απεικόνιση ισοζυγίου μάζας στις φλούδες πορτοκαλιού, με 100 g αρχικό ξηρό βάρος

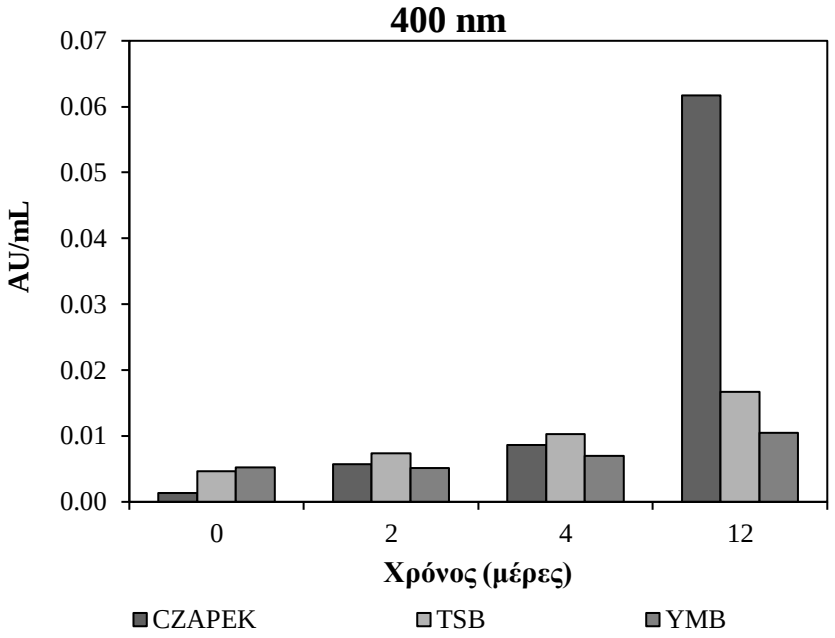
3.3 Αποτελέσματα ζυμώσεων

3.3.1 Υγρές καλλιέργειες

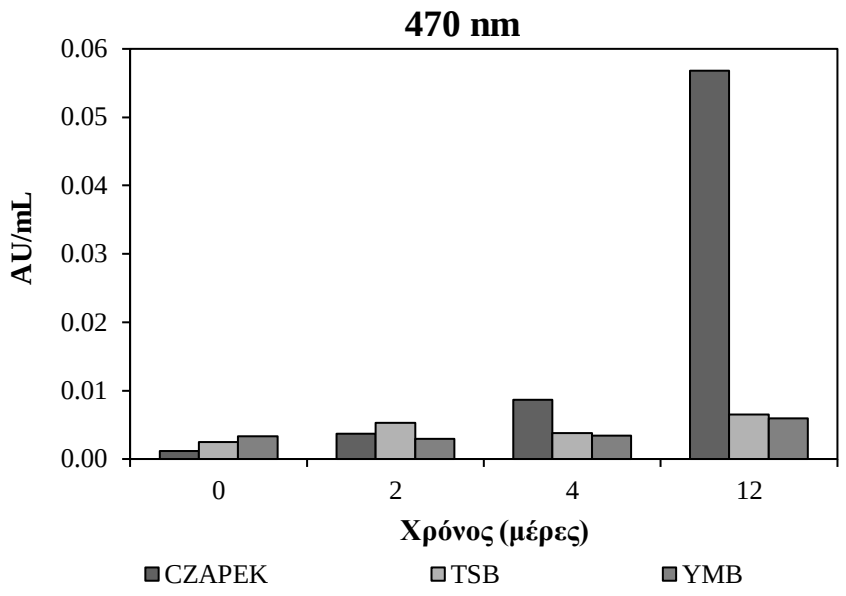
3.3.1.1 Εμπορικά υποστρώματα CZAPEK broth, TSB και YMB

Στο υπόστρωμα στο οποίο παρατηρήθηκε παραγωγή εξωκυτταρικής χρωστικής, ήταν το Czapek broth, γεγονός που διαπιστώθηκε και από τη μέτρηση των απορροφήσεων στα 400, 470 και 500 nm και οι οποίες στο τέλος της ζύμωσης ήταν

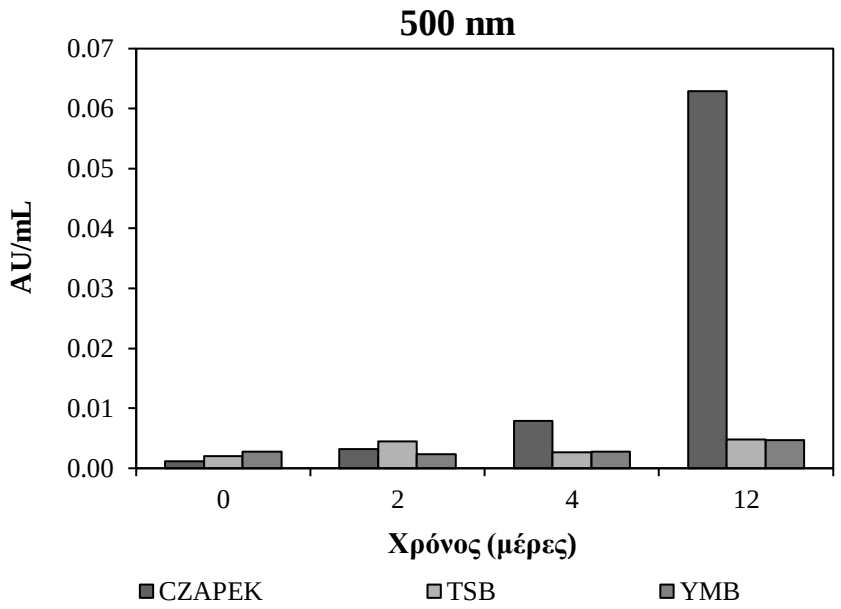
0,062, 0,057 και 0,063 AU/mL, αντίστοιχα. Αντίθετα, στα υποστρώματα του TSB και του YMB, ενώ ο μύκητας φάνηκε πως αναπτύχθηκε, δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα δύο παραγωγή κόκκινης χρωστικής. Στα γραφήματα 3.1, 3.2 και 3.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των απορροφήσεων στα διάφορα μήκη κύματος για το Czapek, το TSB και το YMB, με τις οπτικές πυκνότητες να είναι εκφρασμένες ανά mL (AU/mL).



Γράφημα 3. 1 Σύγκριση απορροφήσεων/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400 nm, για τα υποστρώματα του Czapek broth, TSB και YMB



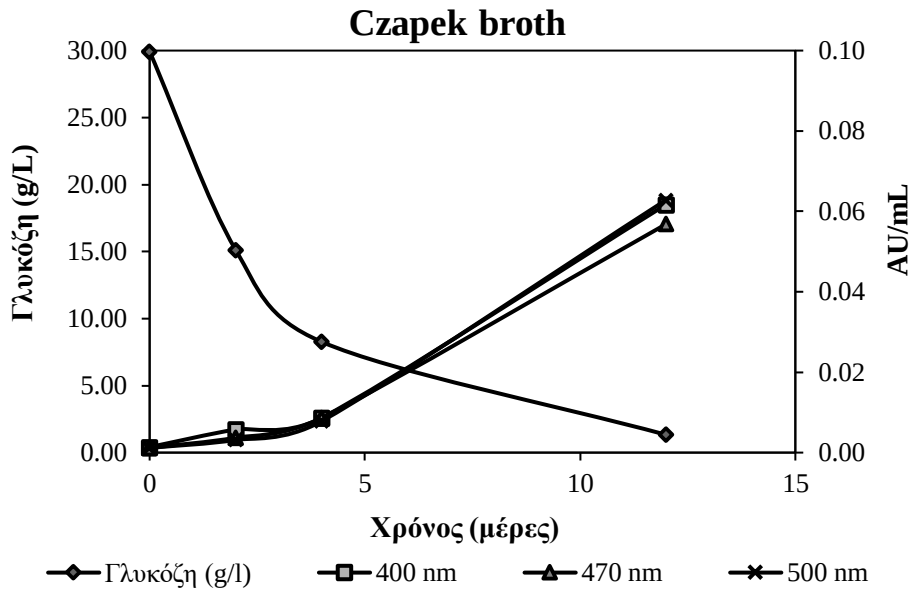
Γράφημα 3. 2 Σύγκριση απορροφήσεων/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 470 nm, για τα υποστρώματα του Czapek broth, TSB και YMB



Γράφημα 3. 3 Σύγκριση απορροφήσεων/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 500 nm, για τα υποστρώματα του Czapek broth, TSB και YMB

Έτσι, στο υπόστρωμα του Czapek η παραγωγή της χρωστικής ήταν επιτυχής, σε σχέση με τα άλλα δύο. Συγκεκριμένα, τα αρχικά 29,93 g/L γλυκόζης για τον χρόνο t=0, στο τέλος της επώασης, για χρόνο t=12 ημέρες, η συγκέντρωση του σακχάρου μειώθηκε στο 1,33 g/L. Επιπλέον από την 4^{η} κιόλας ημέρα της διάρκειας της

ζύμωσης, όπου η συγκέντρωση του σακχάρου είχε ελαττωθεί στα 8,26 g/L, παρατηρήθηκε και η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής από τον μύκητα και η οποία κορυφώθηκε κατά τη 12η ημέρα της καλλιέργειας. Στο γράφημα 3.4 που παρατίθεται παρακάτω, παρουσιάζεται η κατανάλωση του σακχάρου της γλυκόζης για το υπόστρωμα Czapek, καθώς επίσης και οι απορροφήσεις της παραγόμενης χρωστικής, στα τρία διαφορετικά μήκη κύματος.



Γράφημα 3. 4 Απεικόνιση της κατανάλωσης του σακχάρου της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων /mL της παραγόμενης χρωστικής, στα 400, 470 και 500 nm, με υπόστρωμα το Czapek broth

Εφόσον στο εμπορικό υπόστρωμα του Czapek ο μύκητας παρήγαγε την επιθυμητή χρωστική, τόσο η παραγωγικότητα (productivity), όσο και η απόδοση (yield) σημείωσαν τις υψηλότερες τιμές για αυτό το υπόστρωμα, σε σχέση με τα άλλα δύο. Στον πίνακα 3.15 παρουσιάζεται η παραγωγικότητα της ζύμωσης για τα τρία εμπορικά υπόστρωμα του Czapek, TSB και YMB, εκφρασμένη σε AU/mL/μέρες ζύμωσης, ενώ ο πίνακας 3.16 απαρτίζεται από την απόδοση της ζύμωσης, μόνο για το Czapek, εκφρασμένη σε AU/mL/g σακχάρου.

Πίνακας 3. 15 Παραγωγικότητα ζύμωσης για τα εμπορικά υποστρώματα Czapek, TSB και YMB, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=12 ημέρες

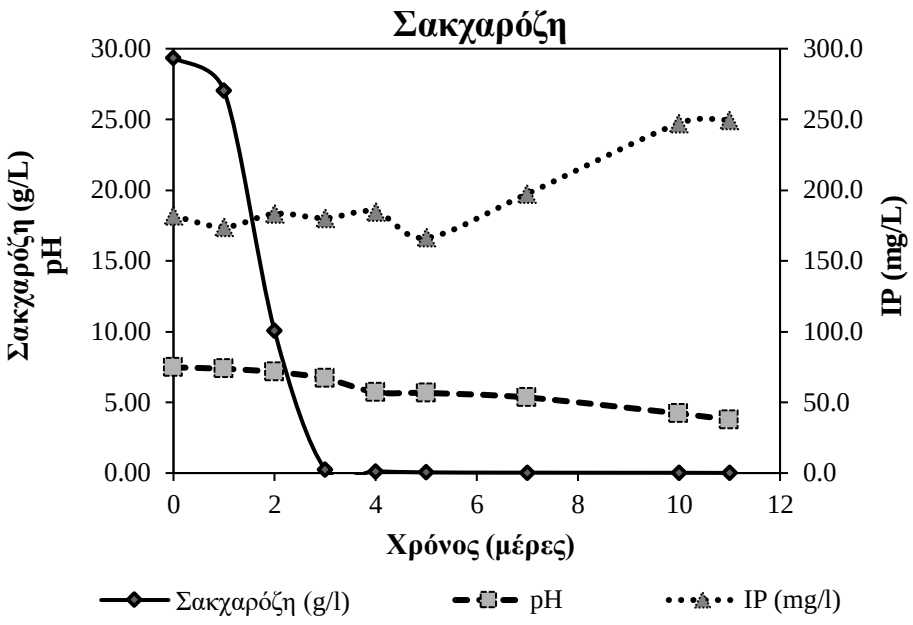
	Παραγωγικότητα (AU/mL/μέρες ζύμωσης)		
Υπόστρωμα	**400 nm**	**470 nm**	**500 nm**
Czapek	0,005	0,005	0,005
TSB	0,001	0,001	0,000
YMB	0,001	0,000	0,000

Πίνακας 3. 16 Απόδοση ζύμωσης για το εμπορικό υπόστρωμα Czapek, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=12 ημέρες

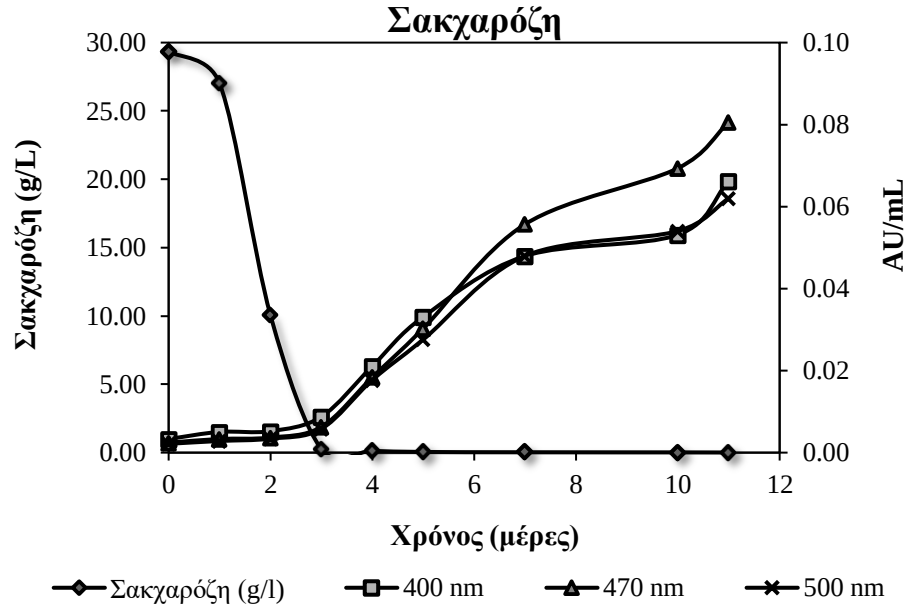
	Απόδοση (AU/mL/g σακχάρου)		
Υπόστρωμα	**400 nm**	**470 nm**	**500 nm**
Czapek	0,046	0,043	0,047

3.3.1.2 Εμπορικά σάκχαρα – σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη και διάλυμα αλάτων

Στις υγρές καλλιέργειες στις οποίες η πηγή άνθρακα ήταν σακχαρόζη, παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση του σακχάρου, μέχρι και την ημέρα ολοκλήρωσης του χρόνου επώασης. Καθώς η συγκέντρωση της σακχαρόζης μειωνόταν, η παραχθείσα κόκκινη χρωστική από τον μύκητα, φάνηκε από την 3^{η} ημέρα της επώασης, κατά την οποία το σάκχαρο είχε ελαττωθεί στα 0,26 g/L. Ενώ όμως η ποσότητα της σακχαρόζης καταναλώθηκε σχεδόν ολοκληρωτικά από τον μύκητα, η συγκέντρωση σε ανόργανο φώσφορο, όχι μόνο δεν ελαττώθηκε, αλλά μέχρι και το τέλος της επώασης παρουσίασε αύξηση. Αντίστοιχη μεταβλητή τιμή παρατηρήθηκε και για το pH της καλλιέργειας. Με την πάροδο του χρόνου ζύμωσης, η τιμή του pH μειώθηκε, φτάνοντας στο 3,76 τη 11^{η} ημέρα, ενώ η ελάττωση αυτή ξεκίνησε να παρατηρείται από την ημέρα κατά την οποία ξεκίνησε και η παραγωγή της χρωστικής. Στο γράφημα 3.5 παρουσιάζονται οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε σακχαρόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.6 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της σακχαρόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

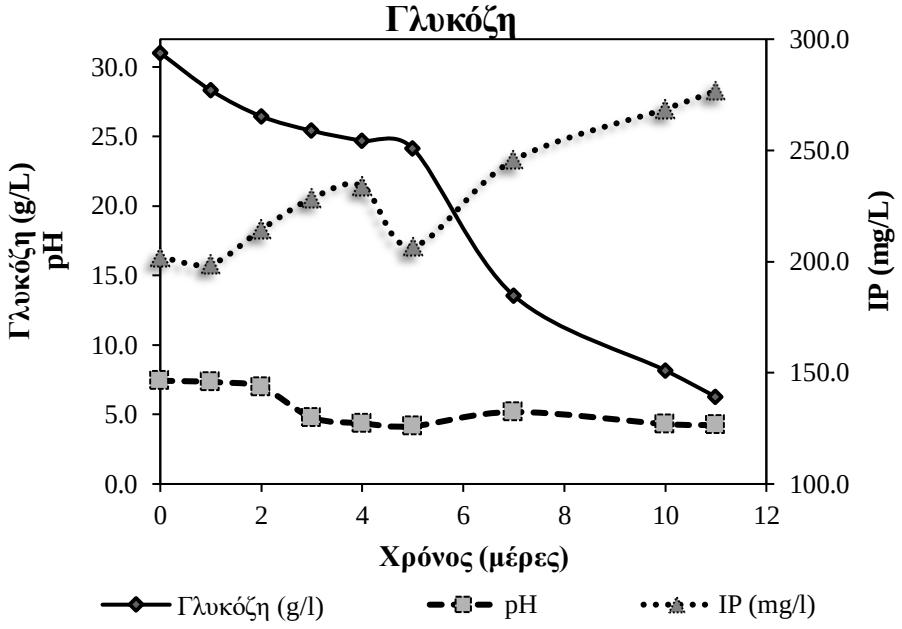


Γράφημα 3. 5 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP) (mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων

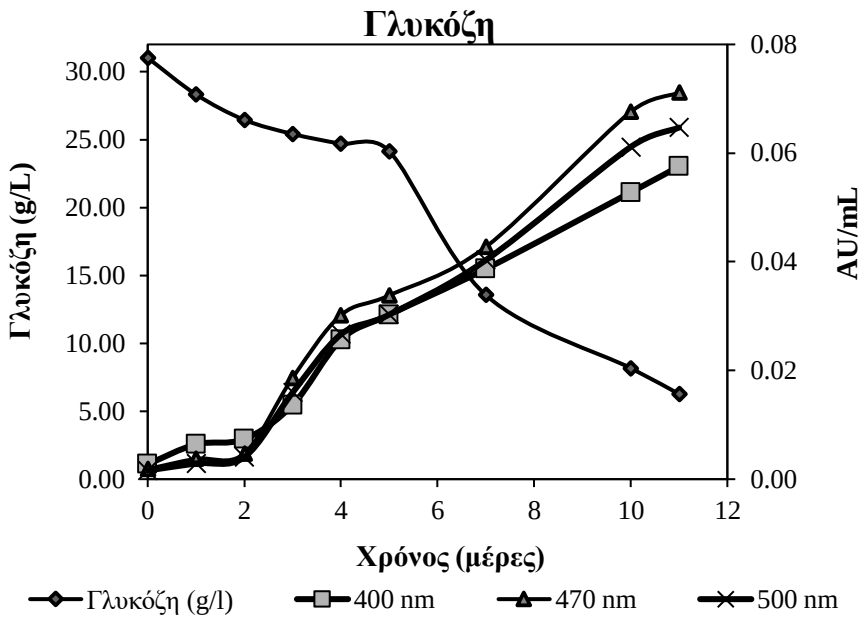


Γράφημα 3. 6 Απεικόνιση της κατανάλωσης του σακχάρου της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων

Όσον αφορά στις υγρές καλλιέργειες στις οποίες η πηγή άνθρακα ήταν η γλυκόζη, αυτό δεν καταναλώθηκε πλήρως όπως συνέβη στην περίπτωση της σακχαρόζης. Η παραγωγή της χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται από την 2η κιόλας ημέρα της ζύμωσης, στην οποία η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν στα 26,45 g/L. Και στην περίπτωση της γλυκόζης, το pH δεν διατηρήθηκε σε μία σταθερή τιμή, αλλά παρουσίασε μείωση και η οποία παρατηρήθηκε περισσότερο κατά την 5η ημέρα της επώασης, ενώ την 11η ημέρα έφτασε στην τιμή του 4,24. Τέλος, ο ανόργανος φώσφορος δεν φάνηκε να καταναλώθηκε από τον μύκητα και για την περίπτωση της γλυκόζης, ενώ σε όλη τη διάρκεια της επώασης η συγκέντρωσή του αυξήθηκε. Στο γράφημα 3.7 παρουσιάζονται οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε γλυκόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.8 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της γλυκόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

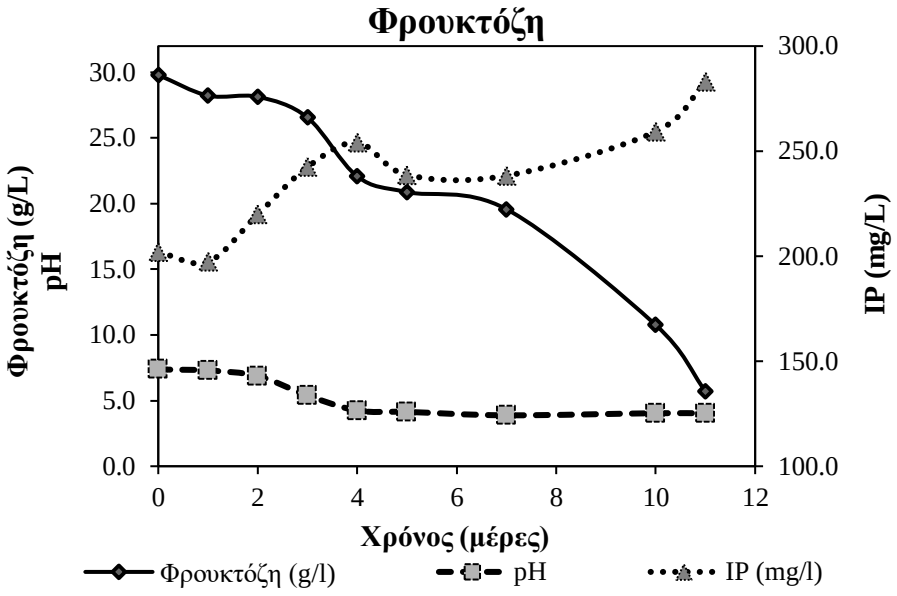


Γράφημα 3. 7 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP) (mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων

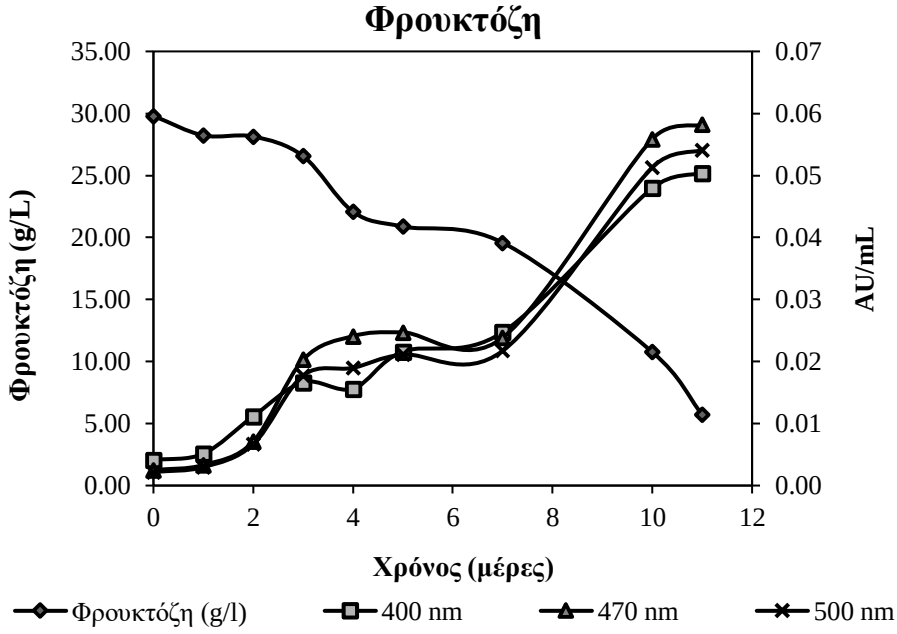


Γράφημα 3. 8 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων

Τέλος, στις υγρές καλλιέργειες στις οποίες η πηγή άνθρακα ήταν η φρουκτόζη, δεν παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση του σακχάρου, όπως συνέβη στην περίπτωση της σακχαρόζης. Η παραγωγή της χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται από την 3η ημέρα της ζύμωσης, όπου η συγκέντρωση της φρουκτόζης ήταν στα 26,56 g/L. Και σε αυτή την περίπτωση, το pH δεν παρέμεινε σε μία σταθερή τιμή, αλλά παρουσίασε μείωση και η οποία παρατηρήθηκε περισσότερο κατά την 7η ημέρα της επώασης, φτάνοντας στην τιμή του 3,88. Τέλος, ο ανόργανος φώσφορος δεν καταναλώθηκε από τον μύκητα και για την περίπτωση της φρουκτόζης, ενώ η συγκέντρωσή του αυξήθηκε. Στο γράφημα 3.9 παρουσιάζονται οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε φρουκτόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.10 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της φρουκτόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.



Γράφημα 3. 9 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της φρουκτόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP) (mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων



Γράφημα 3. 10 Απεικόνιση της κατανάλωσης της φρουκτόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων

Η παραγωγικότητα της ζύμωσης δεν παρουσίασε μεγάλες αποκλίσεις για τα τρία εμπορικά σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν, με τις τιμές AU/mL/μέρες ζύμωσης να κυμαίνονται στο 0,006-0,007. Αντιθέτως, το σάκχαρο της σακχαρόζης είχε την υψηλότερη απόδοση, σημειώνοντας κατά την 11η ημέρα της καλλιέργειας, τις τιμές των 6,62, 8,06 και 6,20 AU/mL g σακχάρου, για τα 440, 470 και 500 nm, αντίστοιχα. Στον πίνακα 3.17 παρουσιάζεται η παραγωγικότητα της ζύμωσης για τα τρία εμπορικά σάκχαρα της σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης, εκφρασμένη σε AU/mL/μέρες ζύμωσης, ενώ ο πίνακας 3.18 απαρτίζεται από την απόδοση της ζύμωσης, εκφρασμένη σε AU/mL/g σακχάρου.

Πίνακας 3. 17 Παραγωγικότητα ζύμωσης για την σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=11 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων

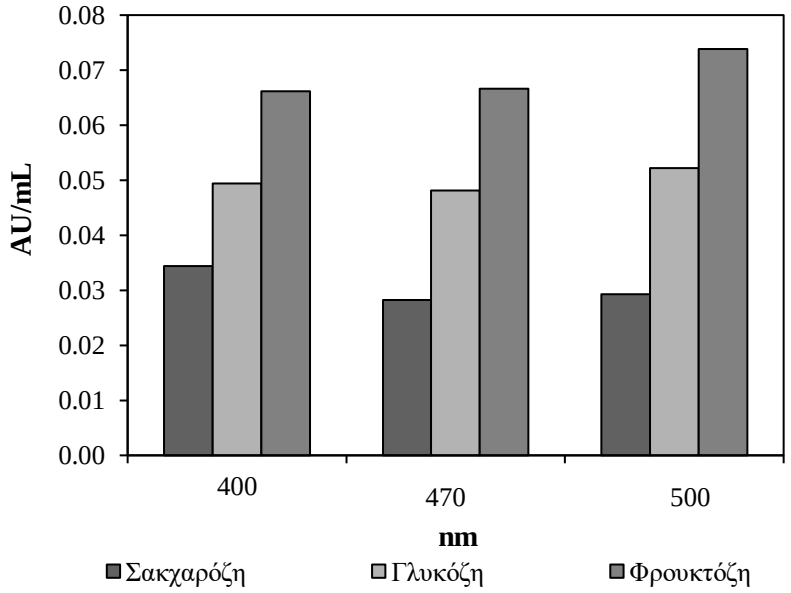
Παραγωγικότητα (AU/mL/μέρες ζύμωσης)			
Σάκχαρο	**400 nm**	**470 nm**	**500 nm**
Σακχαρόζη	0,006	0,007	0,006
Γλυκόζη	0,005	0,006	0,006
Φρουκτόζη	0,005	0,005	0,005

Πίνακας 3. 18 Απόδοση ζύμωσης για την σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=11 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων

Απόδοση (AU/mL/g σακχάρου)			
Σάκχαρο	**400 nm**	**470 nm**	**500 nm**
Σακχαρόζη	6,62	8,06	6,20
Γλυκόζη	0,01	0,02	0,01
Φρουκτόζη	0,01	0,01	0,01

Την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης διαδέχθηκαν οι εκχυλίσεις των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών χρωστικών, από τη βιομάζα και το υπερκείμενο, αντίστοιχα. Από την εκχύλιση της εξωκυτταρικής χρωστικής με τη χρήση του οξικού αιθυλεστέρα, η χρωστική εκχυλίστηκε ικανοποιητικώς. Η μέτρηση του χρώματος έδειξε και για τα τρία σάκχαρα, που χρησιμοποιήθηκαν απορροφήσεις/mL, με

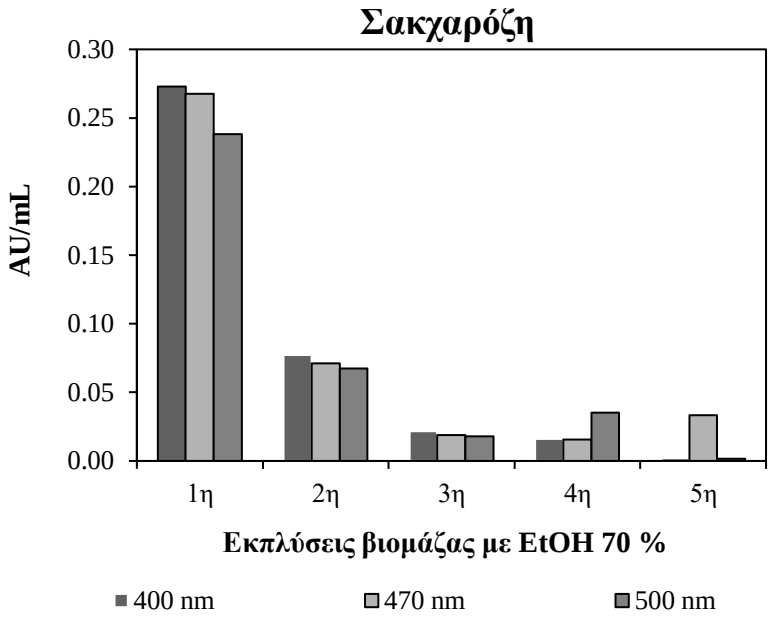
σχετικά μικρή απόκλιση μεταξύ τους, ενώ η μεγαλύτερη τιμή καταγράφηκε στο μήκος κύματος των 500 nm και το σάκχαρο της φρουκτόζης (0,074 AU/mL). Από την άλλη, οι χαμηλότερες τιμές απορροφήσεων/mL και άρα μικρότερη απόδοση στην εκχύλιση της χρωστικής παρατηρήθηκαν στις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη και ειδικότερα στο μήκος κύματος του πορτοκαλί χρώματος (0,028 AU/mL), ενώ η απορρόφηση για την κόκκινη χρωστική καταγράφηκε στο 0,029 AU/mL.



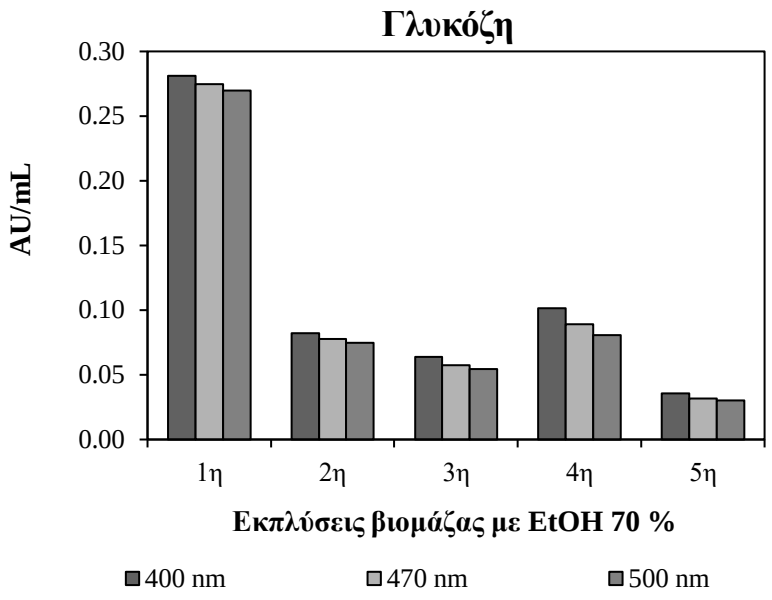
Γράφημα 3. 11 Απεικόνιση απορροφήσεων/mL κατά τις εκχυλίσεις των χρωστικών από το υπερκείμενο των ζυμώσεων με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων

Εξίσου επιτυχής ήταν και η εκχύλιση της ενδοκυτταρικής, από τη βιομάζα, χρωστικής. Οι τιμές των απορροφήσεων που καταγράφηκαν ήταν μεγαλύτερες από εκείνες της εξωκυτταρικής χρωστικής, τουλάχιστον για την 1η έκπλυση. Όσο η έκπλυση της βιομάζας με την EtOH πραγματοποιούταν, τόσο μικρότερη ήταν και η τιμή της μέτρησης του χρώματος, γεγονός που οδηγούσε στο συμπέρασμα της άρτιας και επιτυχούς εκχύλισης της χρωστικής. Μεγαλύτερη τιμή απορρόφησης/mL και για τα τρία μήκη κύματος, κατά την 1η έκπλυση, έλαβε η φρουκτόζη, ενώ η βιομάζα, η οποία βάσει της μέτρησης για την 5η έκπλυση, φάνηκε να εκπλύθηκε σχεδόν ολοκληρωτικά, ήταν αυτή η οποία προερχόταν από την υγρή καλλιέργεια της σακχαρόζης με τιμή απορρόφησης 0,002/mL για τα 400 και 500 nm. Από όλες τις εκπλύσεις της βιομάζας, η υψηλότερη παραγωγή σε ενδοκυτταρική χρωστική σημειώθηκε με στην καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη, καθώς δεν

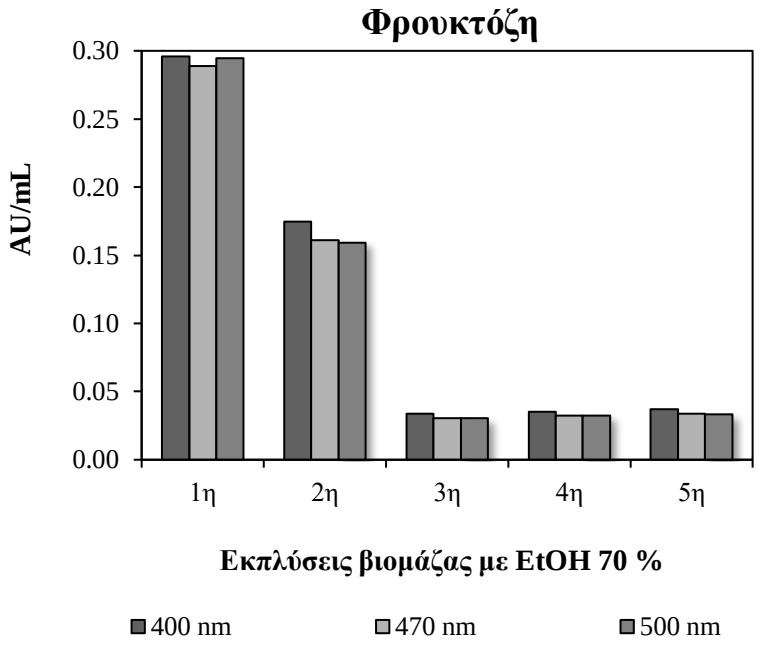
εκπλύθηκε ολοκληρωτικά, καταγράφοντας τη μεγαλύτερη απορρόφηση/mL, για τα 500 nm τουλάχιστον. Οι απορροφήσεις των διαδοχικών εκπλύσεων με την EtOH στις βιομάζες για τα σάκχαρα της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης και στα τρία μήκη κύματος, φαίνονται στα διαγράμματα 3.12, 3.13 και 3.14, αντίστοιχα.



Γράφημα 3. 12 Απορροφήσεις/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων



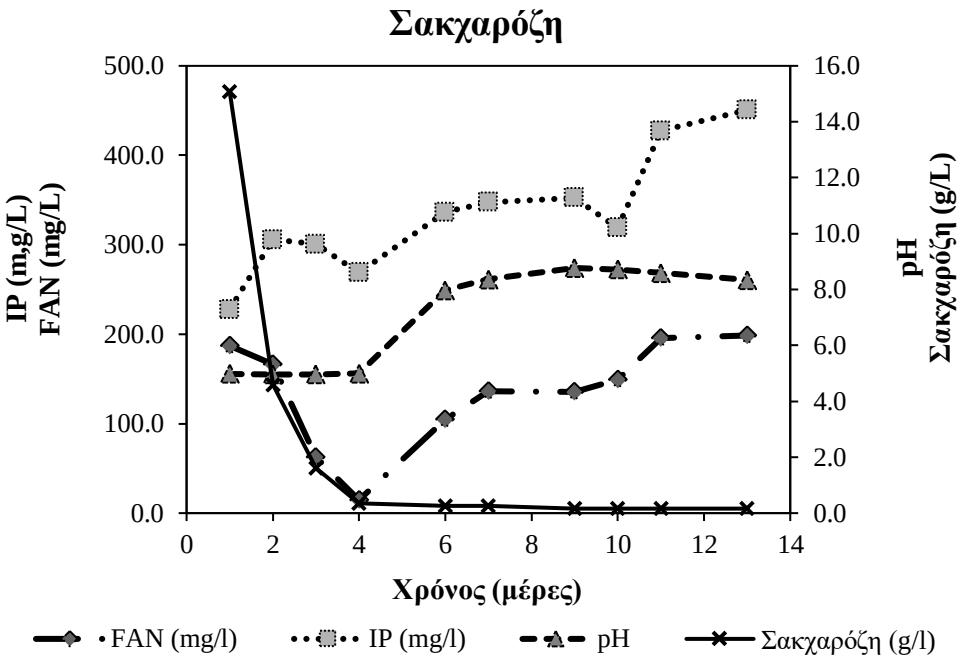
Γράφημα 3. 13 Απορροφήσεις/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων



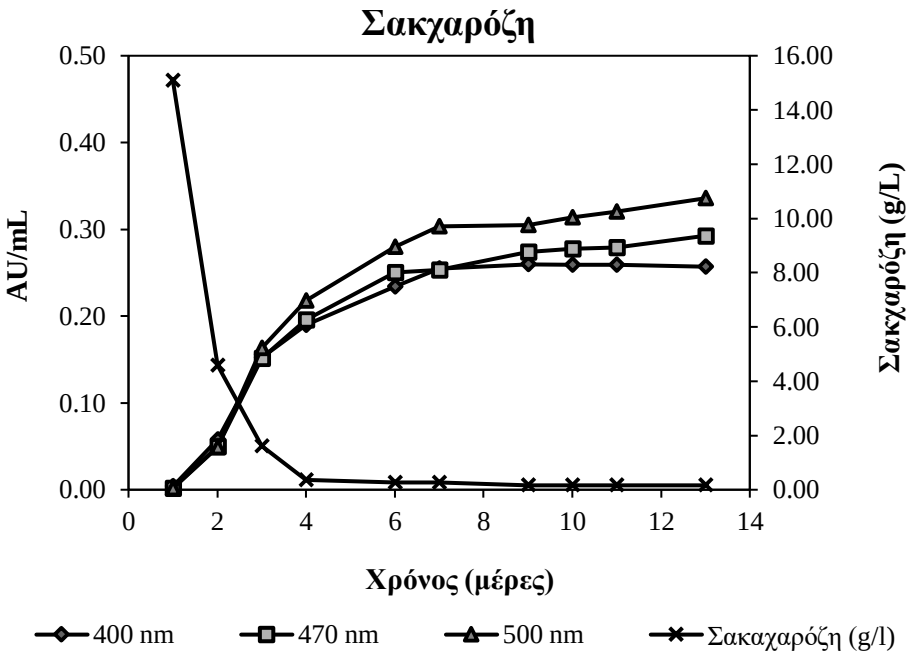
Γράφημα 3. 14 Απορροφήσεις/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα και διάλυμα αλάτων

3.3.1.3 Εμπορικά σάκχαρα – σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract solution) και ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution)

Στις υγρές καλλιέργειες στις οποίες η πηγή άνθρακα ήταν η σακχαρόζη, παρατηρήθηκε ότι το σάκχαρο είχε καταναλωθεί από τον μύκητα σχεδόν εξ' ολοκλήρου. Πιο συγκεκριμένα, από την 1^{η} κιόλας ημέρα της επώασης η συγκέντρωση του σακχάρου είχε ελαττωθεί στα 15,08 g/L. Επίσης, διαπιστώθηκε μια ελάττωση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) με τα 187,06 mg/L κατά την 1^{η} ημέρα να μειώνονται στα 14,62 mg/L κατά την 4^{η} ημέρα της επώασης. Από την 6^{η} όμως ημέρα και μέχρι και το τέλος του χρόνου επώασης, το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων παρουσίασε μια σταδιακή αύξηση, φτάνοντας τα 198,58 mg/L την τελευταία ημέρα της ζύμωσης. Τέλος, η παραγωγή της χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται ήδη από τη 2^{η} ημέρα της επώασης, όπου η συγκέντρωση σε σακχαρόζη είχε μειωθεί στα 4,59 g/L, ενώ από την 4^{η} και μετά η ένταση σε χρώμα ήταν ακόμα πιο έντονη. Στο γράφημα 3.15 παρουσιάζονται οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε σακχαρόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.16 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της σακχαρόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

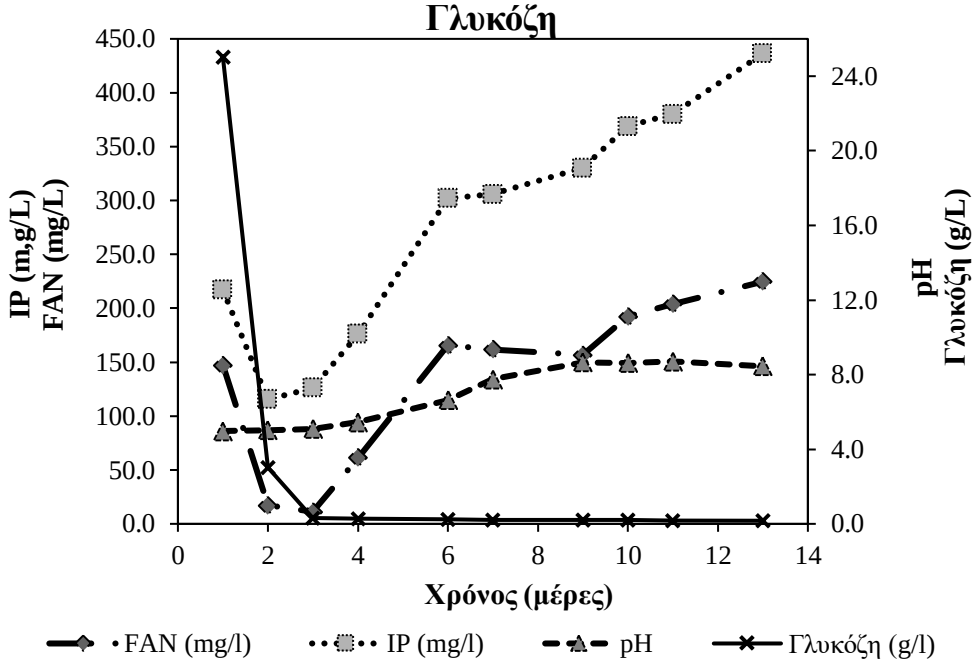


Γράφημα 3. 15 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP) (mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα

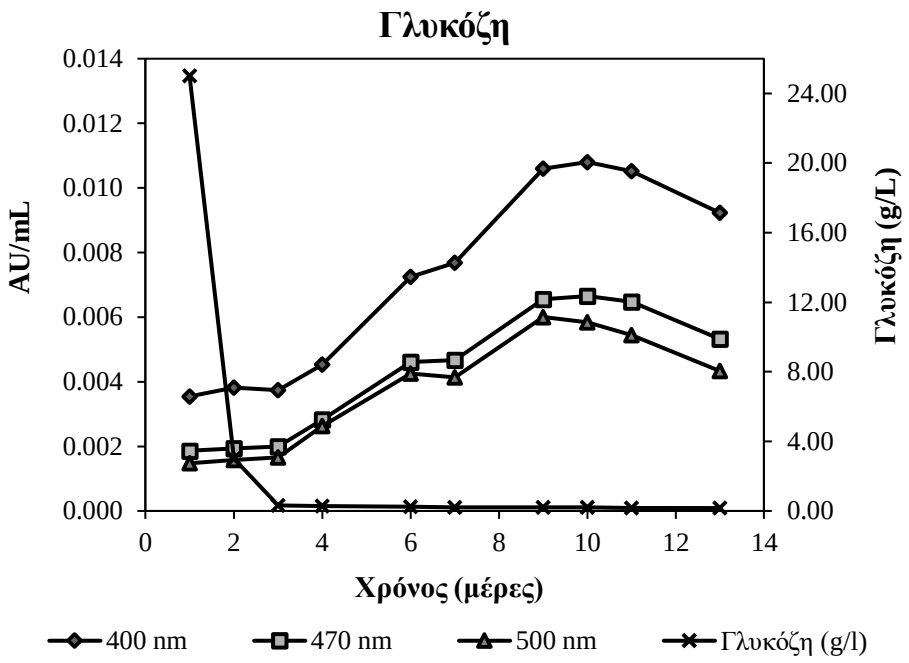


Γράφημα 3. 16 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα

Όσον αφορά στις υγρές καλλιέργειες στις οποίες η πηγή άνθρακα ήταν η γλυκόζη, αυτό καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως όπως συνέβη στην περίπτωση της σακχαρόζης. Συγκεκριμένα, από την 1η ημέρα της καλλιέργειας η συγκέντρωση σε γλυκόζη καταγράφηκε στα 25,02 g/L, ενώ από την 3η ημέρα μέχρι και την ολοκλήρωση του χρόνο επώασης (13η ημέρα) η κατανάλωση σε γλυκόζη από τον μύκητα ήταν απότομη, σημειώνοντας περιεκτικότητες 3,09 και 0,17 g/L, αντίστοιχα. Επιπλέον, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε μια ελάττωση στη συγκέντρωση, με τα 147,24 mg/L κατά την 1η ημέρα να μειώνονται στα 11,26 mg/L κατά την 3η ημέρα της επώασης. Παρόλ' αυτά, η παραγωγή σε χρωστική δεν ήταν τόσο επιτυχής όσο στην περίπτωση της σακχαρόζης, με το φασματοφωτόμετρο να καταγράφει σχετικά μικρές τιμές απορρόφησης και στα τρία μήκη κύματος. Στο γράφημα 3.17 παρουσιάζονται οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε γλυκόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.18 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της γλυκόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

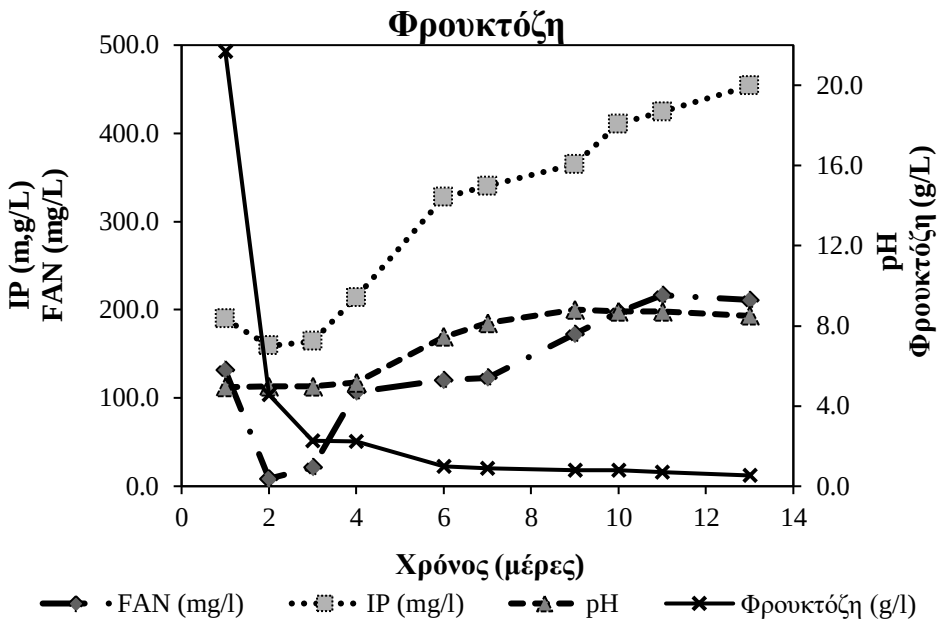


Γράφημα 3. 17 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP) (mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα

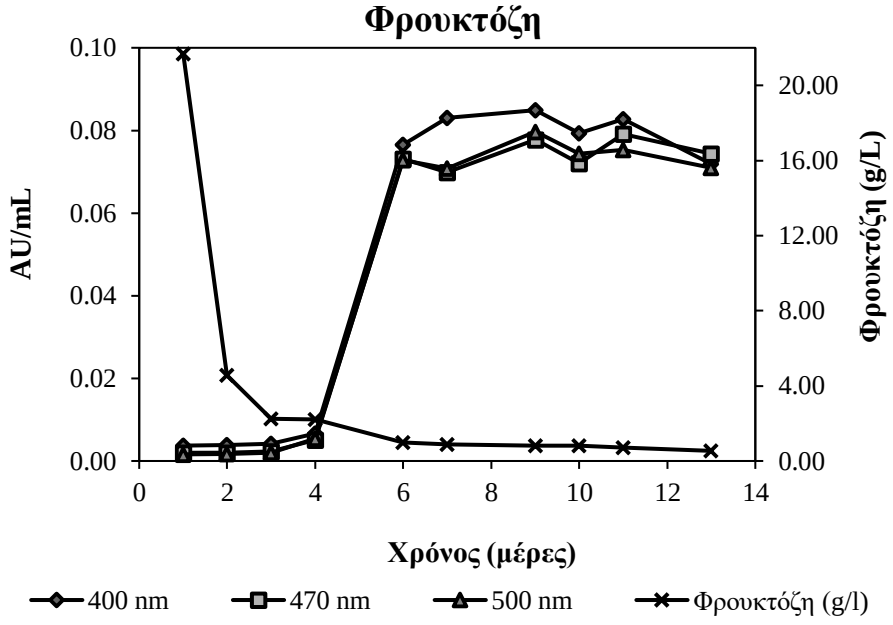


Γράφημα 3. 18 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα

Τέλος, στις υγρές καλλιέργειες στις οποίες η πηγή άνθρακα ήταν η φρουκτόζη, το σάκχαρο καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως όπως συνέβη στις περιπτώσεις της σακχαρόζης και της γλυκόζης. Ειδικότερα, από την 1^{η} ημέρα της ζύμωσης η συγκέντρωση σε φρουκτόζη καταγράφηκε στα 21,69 g/L, ενώ από την 2^{η} ημέρα μέχρι και την ολοκλήρωση του χρόνο επώασης (13^{η} ημέρα), η κατανάλωση σε φρουκτόζη ήταν μεγάλη, σημειώνοντας περιεκτικότητες των 4,58 και 0,54 g/L, αντίστοιχα. Τέλος, η παραγωγή της χρωστικής άρχισε να παρατηρείται από τη 4^{η} ημέρα της επώασης, όπου η συγκέντρωση σε φρουκτόζη είχε μειωθεί στα 2,23 g/L, ενώ από την 6^{η} και μετά η ένταση σε χρώμα έγινε περισσότερο εμφανής. Στο γράφημα 3.19 παρουσιάζονται οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε φρουκτόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.20 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της φρουκτόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.



Γράφημα 3. 19 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της φρουκτόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα



Γράφημα 3. 20 Απεικόνιση της κατανάλωσης της φρουκτόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα

Για το σάκχαρο της σακχαρόζης παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές παραγωγικότητας και για τρία μήκη κύματος, ενώ λιγότερο παραγωγικό ήταν το

σάκχαρο της γλυκόζης σημειώνοντας σχεδόν μηδενικές τιμές AU/mL/μέρες ζύμωσης. Αντίστοιχα και η απόδοση της καλλιέργειας, έλαβε κατά την 13η ημέρα τις τιμές 1,59, 1,81 και 2,08 AU/mL/g σακχάρου, για τα 400, 470 και 500 nm, αντίστοιχα, για τη σακχαρόζη. Από την άλλη, με το σάκχαρο της γλυκόζης, η ζύμωση ήταν λιγότερο αποδοτική, έχοντας τις τιμές 0,06, 0,03 και 0,03 AU/mL/g σακχάρου, για τα 400, 470 και 500 nm, αντίστοιχα. Στον πίνακα 3.19 παρουσιάζεται η παραγωγικότητα της ζύμωσης για τα τρία εμπορικά σάκχαρα της σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης, εκφρασμένη σε AU/mL/μέρες ζύμωσης, ενώ ο πίνακας 3.20 απαρτίζεται από την απόδοση της ζύμωσης, εκφρασμένη σε AU/mL/g σακχάρου.

Πίνακας 3. 19 Παραγωγικότητα ζύμωσης για την σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=13 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα

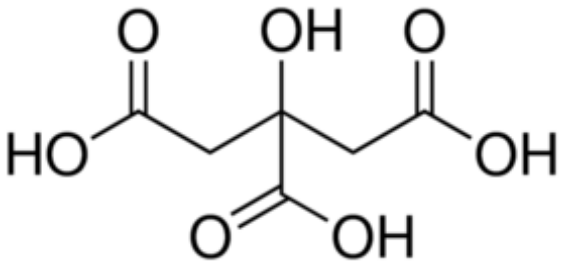
Παραγωγικότητα (AU/mL / μέρες ζύμωσης)			
Σάκχαρο	**400 nm**	**470 nm**	**500 nm**
Σακχαρόζη	0,020	0,023	0,026
Γλυκόζη	0,001	0,001	0,000
Φρουκτόζη	0,007	0,006	0,006

Πίνακας 3. 20 Απόδοση ζύμωσης για την σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t=13 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα

Απόδοση (AU/mL/g σακχάρου)			
Σάκχαρο	**400 nm**	**470 nm**	**500 nm**
Σακχαρόζη	1,59	1,81	2,08
Γλυκόζη	0,06	0,03	0,03
Φρουκτόζη	0,13	0,14	0,13

Μετά την ολοκλήρωση των καλλιεργειών ακολούθησαν οι εκχυλίσεις των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών χρωστικών, από τη βιομάζα και το υπερκείμενο, αντίστοιχα, από τα δείγματα της 13ης ημέρας επώασης. Με βάση τις προηγούμενες υγρές καλλιέργειες, στις οποίες ήταν απόντα το διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και το

ρυθμιστικό διάλυμα, ο διαλύτης που ήταν κατάλληλος για την εκχύλιση της εξωκυτταρικής χρωστικής ήταν ο πολικός απρωτικός διαλύτης, οξικός αιθυλεστέρας (διηλεκτρική σταθερά ε= 6,02). Όμως μια απόπειρα εκχύλισης της χρωστικής από το δείγμα της σακχαρόζης οδήγησε σε μη επιθυμητό αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα, η οργανική και η υδατική φάση διαχωρίστηκαν, χωρίς όμως και την παράλληλη εκχύλιση της χρωστικής στην οργανική φάση. Μια εξήγηση για αυτό σχετίζεται τόσο με την τιμή του pH, όσο και με την παρουσία του κιτρικού οξέος στο ρυθμιστικό διάλυμα. Το pH των καλλιεργειών στο τέλος της ζύμωσης, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν γύρω στο 8,5. Επιπλέον, το κιτρικό οξύ είναι ένα μόριο με καρβοξυλομάδες (-COOH), καθιστώντας έτσι πολύ πολικό. Η χρωστική ακόμα, πιθανότατα να περιέχει στη δομή της υδροξυλομάδες (-OH) και οι οποίες λόγω του γεγονότος ότι πρωτονιώνονται, γίνεται υδρόφιλη, δεσμεύεται στην υδατική φάση, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να εκχυλιστεί στην οργανική.



Εικόνα 3. 3 Κιτρικό οξύ (Sigma-Aldrich)

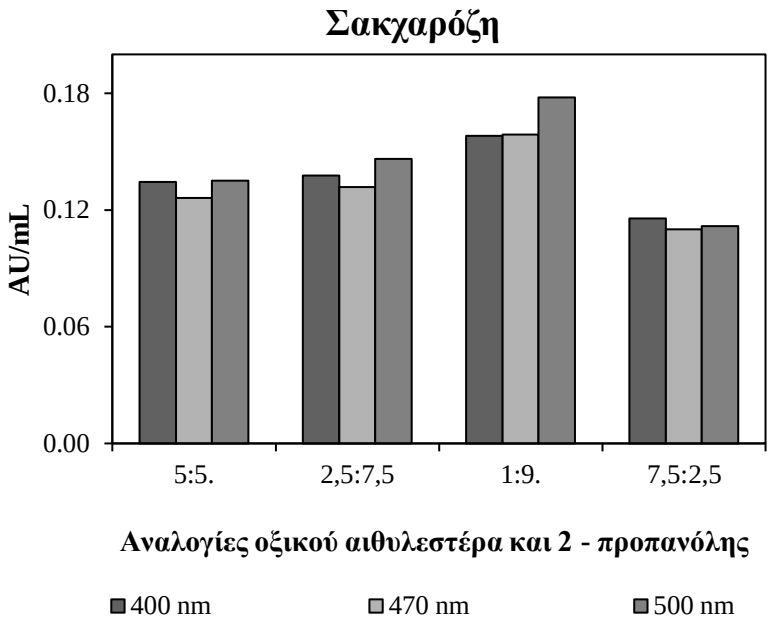
Προκειμένου η χρωστική από το υπερκείμενο να εκχυλιστεί επιτυχώς, επιλέχθηκε επιπλέον ο πολικός πρωτικός διαλύτης της 2-προπανόλης (διηλεκτική σταθερά, ε= 18). Γενικά, τα μόρια διαλύτη, τα οποία θεωρούνται βάσεις κατά Lewis ή διαφορετικά ηλεκτρονιοδότες, σχηματίζουν σύμπλοκες ενώσεις με τα κατιόντα του διαλύματος. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς, τόσο περισσότερο εξασθενημένες είναι οι ελκτικές δυνάμεις των αντιθέτως φορτισμένων σωματιδίων του διαλύματος και άρα τόσο πιο εύκολα μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα μερικώς αρνητικά άκρα του για την επιδιαλύτωση του κατιόντος της διαλυμένης ουσίας. (Γαρούφης, Μαλανδρίνος) Συνεπώς, η προσθήκη του διαλύτη της 2-προπανόλης συνέβαλε σε μεγάλο βαθμό στο να εκχυλιστεί η εξωκυτταρική χρωστική. Αρχικά, στο δείγμα της σακχαρόζης, οι διάφορες αναλογίες οξικού αιθυλεστέρα:2-

προπανόλης που μελετήθηκαν, έδωσαν τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων που παρατίθενται στον πίνακα 3.21.

Πίνακας 3. 21 Βαθμοί εκχύλισης της εξωκυτταρικής χρωστικής από την υγρή καλλιέργεια με πηγή C την σακχαρόζη, με τη χρήση διαφόρων αναλογιών οξικού αιθυλεστέρα και 2-προπανόλης

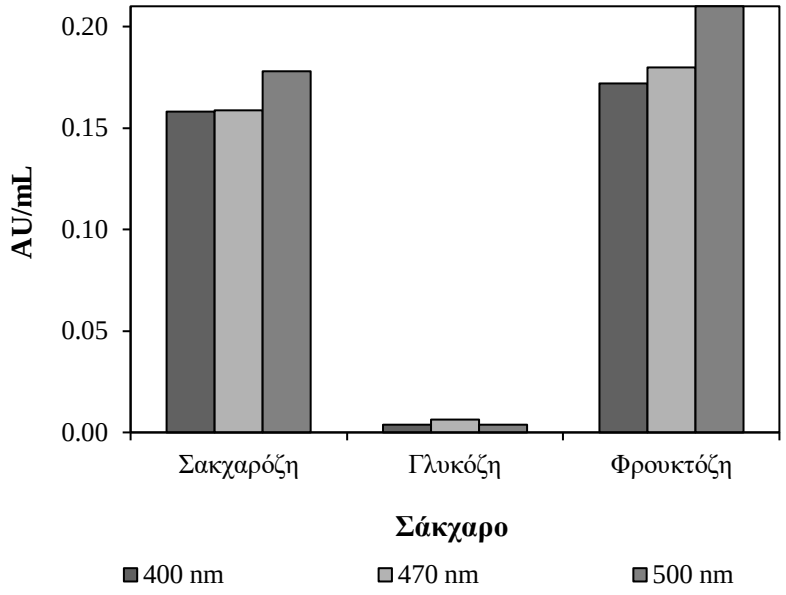
Αναλογία οξικού αιθυλεστέρα/2 – προπανόλης	**Βαθμός εκχύλισης της εξωκυτταρικής χρωστικής από την σακχαρόζη**
5:5	Κανένας διαχωρισμός φάσεων
7,5:2,5	Διαχωρισμός φάσεων, μικρός βαθμός εκχύλισης της χρωστικής
2,5:7,5	Διαχωρισμός φάσεων, μικρός βαθμός εκχύλισης της χρωστικής
1:9	Κανένας διαχωρισμός φάσεων

Η ποσότητα, στη συνέχεια, NaCl, για τη μείωση του ιοντισμού του διαλύματος, προστέθηκε μόνο στις αναλογίες 5:5 και 1:9, στις οποίες η οργανική και η υδατική φάση δεν είχαν διαχωριστεί. Η προσθήκη του κοινού ιόντος, δηλαδή του Na^+, στο κορεσμένο διάλυμα αλάτων του υπερκειμένου της υγρής καλλιέργειας είχε ως αποτέλεσμα την καθίζηση διαφόρων μορφών αλάτων, καθώς επίσης και τη μείωση της διαλυτότητας (S) των δυσδιάλυτων αυτών ηλεκτρολυτών στην υδατική φάση και συνεπώς την παραλαβή της χρωστικής στην οργανική φάση. Κοινώς, η ιοντική ισχύς (μ, $\mu = ½ * \Sigma c_i * z_i^2$, όπου c_i οι μοριακότητες των διαφόρων ιόντων του διαλύματος και z_i τα φορτία αυτών) του διαλύματος μειώθηκε, γεγονός που συνεπάγεται τη μείωση και του γινομένου διαλυτότητας (K_{sp}) των δυσδιάλυτων ηλεκτρολυτών. (Χατζηϊωάννου, 2003) Η προσθήκη του άλατος είχε ως αποτέλεσμα της εκχύλιση της χρωστικής και από τις δύο αναλογίες, με περισσότερο έντονο χρώμα να παρατηρείται στην 1:9. Στο γράφημα 3.21 παρουσιάζονται οι απορροφήσεις/mL των εκχυλιζόμενων εξωκυτταρικών χρωστικών της σακχαρόζης, για τις προαναφερθείσες αναλογίες διαλυτών και στα τρία διαφορετικά μήκη κύματος.



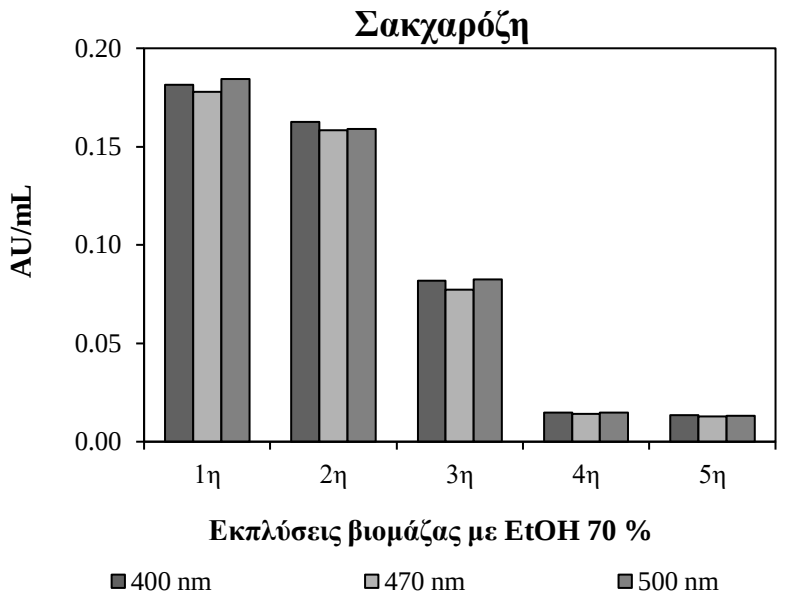
Γράφημα 3. 21 Συγκριτική απεικόνιση των απορροφήσεων/mL των εκχυλιζόμενων εξωκυτταρικών χρωστικών, στα 400, 470 και 500 nm, για τις διάφορες αναλογίες οξικού αιθυλεστέρα και 2-προπανόλης, στις υγρές καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη

Συνεπώς, όπως φαίνεται από τα παραπάνω η αναλογία διαλυτών στην οποία εκχυλίστηκε η εξωκυτταρική χρωστική καλύτερα, ήταν αυτή του 1:9. Δηλαδή σε 0,5 mL δείγμα προστέθηκαν 0,05 mL οξικός αιθυλεστέρας και 0,45 mL 2-προπανόλη και οι απορροφήσεις της εκχυλιζόμενης χρωστικής για τα 400, 470 και 500 nm ήταν 0,158, 0,159 και 0,178 AU/mL, αντίστοιχα. Άρα, σε αυτή την αναλογία επιλέχθηκαν να εκχυλιστούν και οι εξωκυτταρικές χρωστικές, στις οποίες πηγή άνθρακα ήταν η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Τα αποτελέσματα των απορροφήσεων/mL παρουσιάζονται στο γράφημα 3.22 και φαίνεται ότι από την υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη η χρωστική εκχυλίστηκε σε μεγαλύτερο βαθμό, λαμβάνοντας υψηλότερες οπτικές απορροφήσεις, ιδιαίτερα στα 500 nm (0,21 AU/mL).

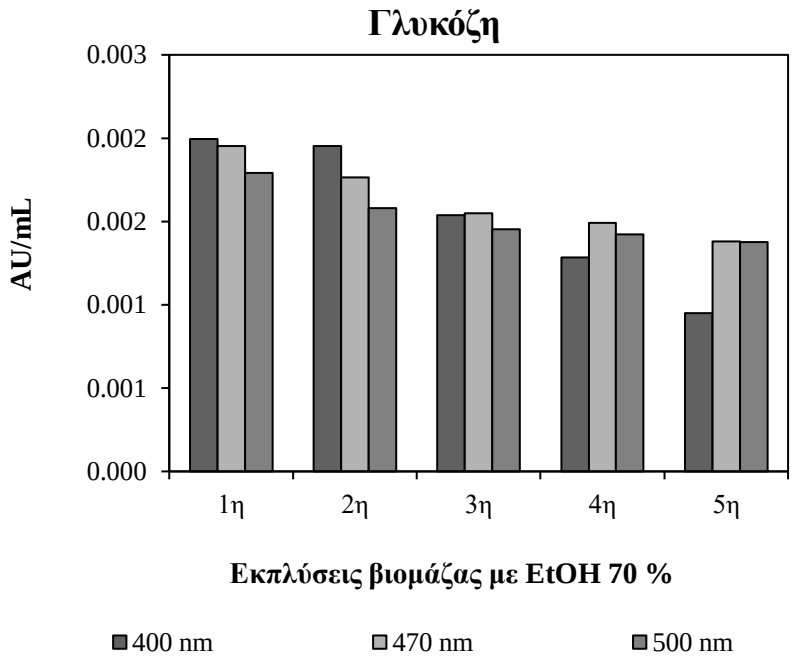


Γράφημα 3. 22 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων εξωκυτταρικών χρωστικών, στα 400, 470 και 500 nm, στην αναλογία 1:9 οξικού αιθυλεστέρα και 2 - προπανόλης, στις υγρές καλλιέργειες με διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα

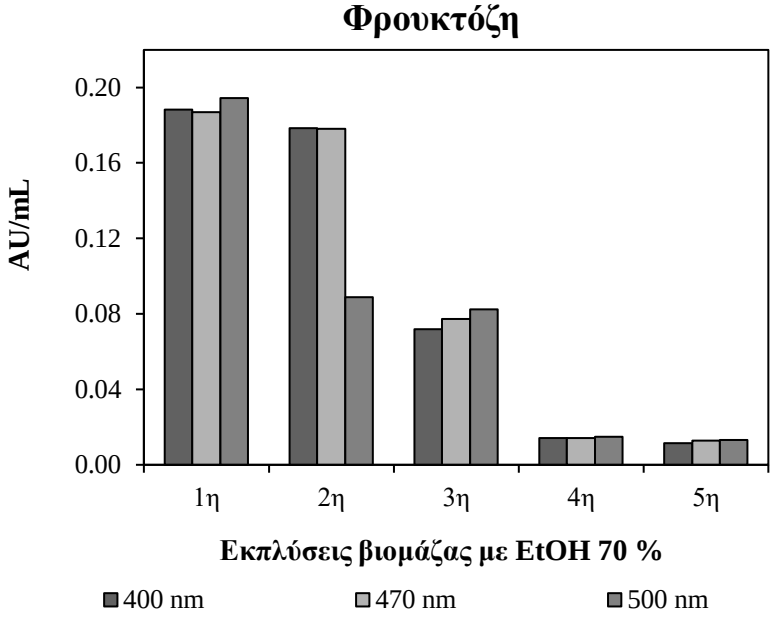
Εξίσου επιτυχής ήταν και η εκχύλιση της ενδοκυτταρικής, από τη βιομάζα, χρωστικής. Οι τιμές των απορροφήσεων που καταγράφηκαν ήταν μεγαλύτερες από εκείνες της εξωκυτταρικής χρωστικής, τουλάχιστον για την 1^{η} και 2^{η} έκπλυση της σακχαρόζης και της φρουκτόζης, ενώ οι τιμές οι οποίες έλαβαν στις υπόλοιπες εκπλύσεις της βιομάζας ήταν με σχετικά μικρές αποκλίσεις. Οι υψηλές τιμές απορροφήσεων κατά τη διάρκεια όλων των εκλύσεων έδειξαν ότι στις ζυμώσεις όπου πηγή άνθρακα ήταν η σακχαρόζη και η φρουκτόζη, η παραγωγή της ενδοκυτταρικής χρωστικής ήταν μεγαλύτερη. Μικρότερες απορροφήσεις παρατηρήθηκαν για τη γλυκόζη, καθώς σε αυτές τις καλλιέργειες δεν παρατηρήθηκε η γενικότερη παραγωγή χρωστικής. Οι απορροφήσεις των διαδοχικών εκπλύσεων με την EtOH στις βιομάζες για τα σάκχαρα της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης και στα τρία μήκη κύματος, φαίνονται στα γραφήματα 3.23, 3.24 και 3.25.



Γράφημα 3. 23 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων / mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα



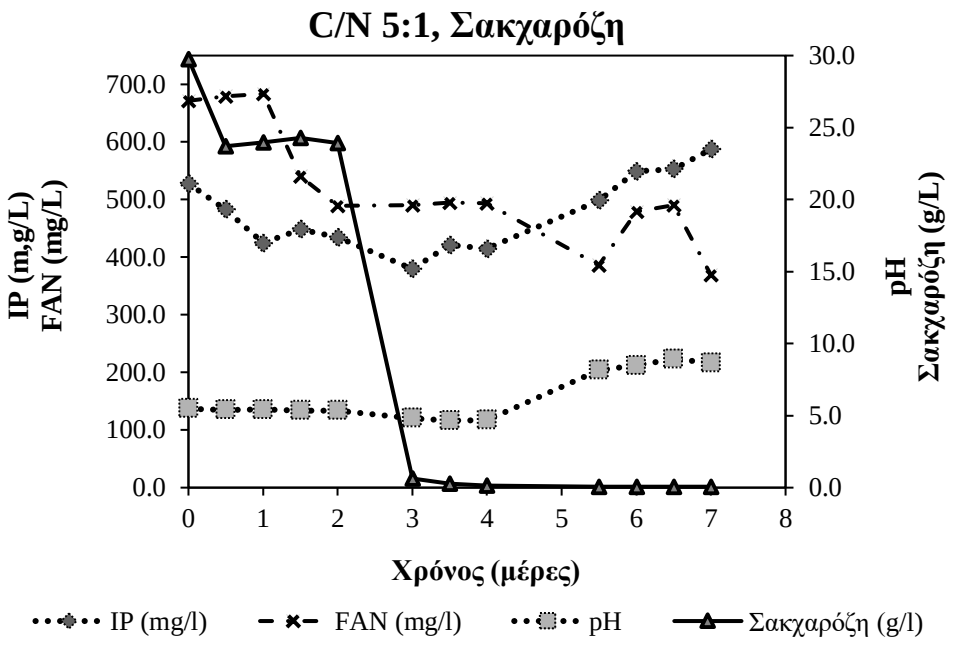
Γράφημα 3. 24 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων / mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα



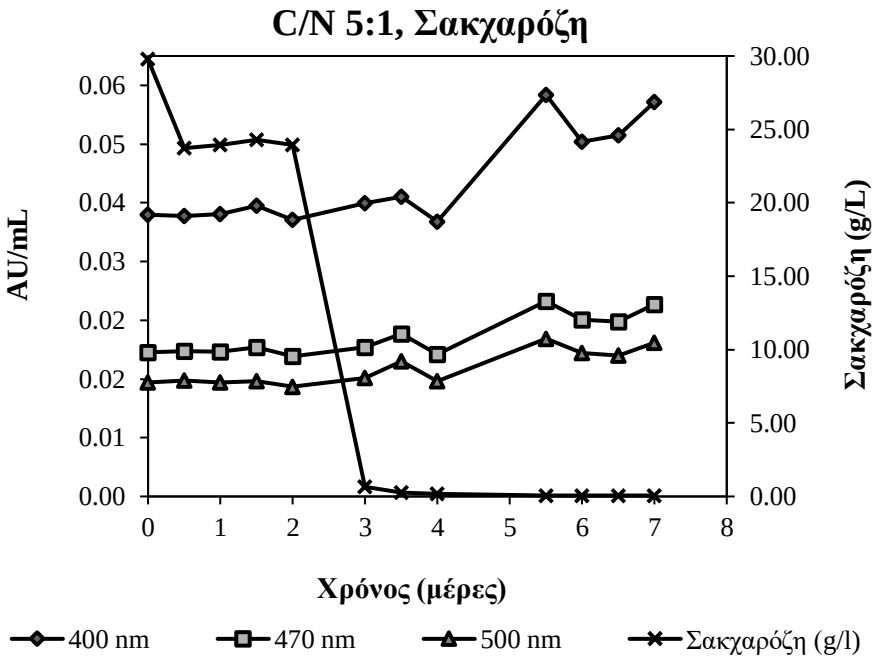
Γράφημα 3. 25 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων / mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη, στις υγρές καλλιέργειες με εμπορικά σάκχαρα, διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα

3.3.1.3 Διάφορες αναλογίες C/N, με εμπορικά σάκχαρα, ως πηγή άνθρακα και εκχύλισμα ζύμης, ως πηγή αζώτου

Στις υγρές καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη και στις οποίες η αναλογία C/N ήταν 5:1, παρατηρήθηκε ότι το σάκχαρο είχε καταναλωθεί από τον μύκητα σχεδόν εξ' ολοκλήρου. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 29,76 g/L, την 1^{η} ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί στα 23,96 g/L, ενώ από τη 3^{η} ημέρα και έπειτα η μείωση σε σακχαρόζη ήταν πιο απότομη, φτάνοντας την 7^{η} ημέρα στην συγκέντρωση των 0,07 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε ελάττωση στη συγκέντρωση καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης, με τα αρχικά 671,07 mg/L να μειώνονται στα 369,11 mg/L κατά το τέλος της ζύμωσης. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής δεν ήταν ιδιαίτερη επιτυχής, με τις απορροφήσεις/mL να σημειώνουν χαμηλές τιμές. Στο γράφημα 3.26 παρουσιάζονται οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε σακχαρόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.27 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της σακχαρόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

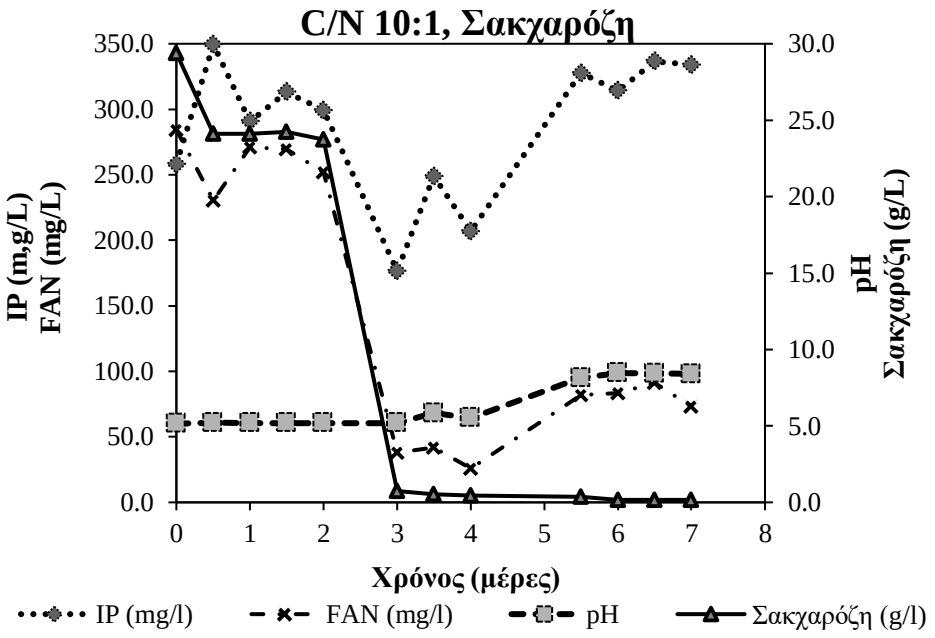


Γράφημα 3. 26 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 5:1

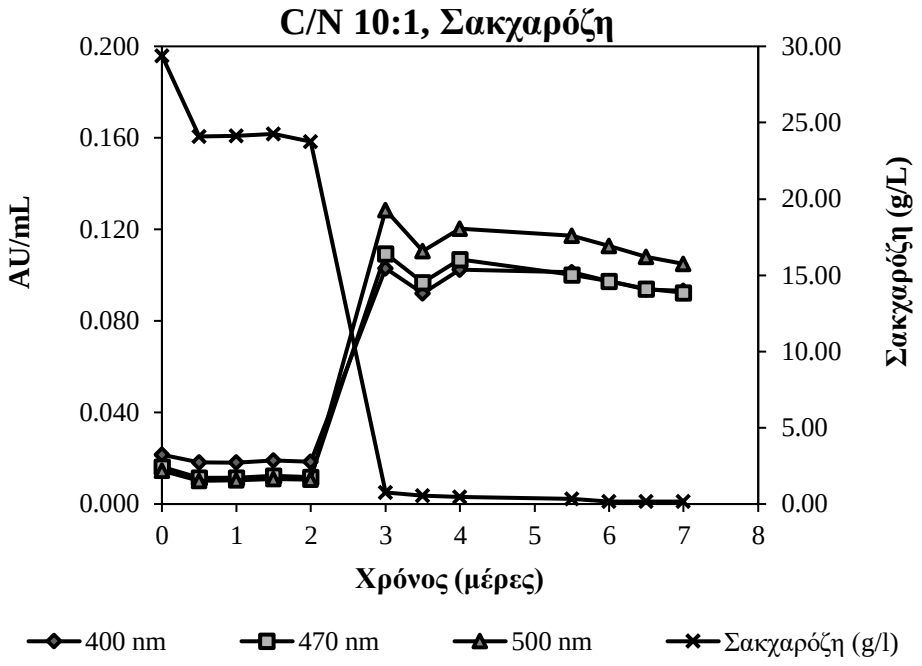


Γράφημα 3.27 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 5:1

Στην αναλογία 10:1 με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, παρατηρήθηκε ότι το σάκχαρο, όπως και στην 5:1 είχε καταναλωθεί από τον μύκητα σχεδόν εξ' ολοκλήρου. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 29,40 g/L, την 1η ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί στα 24,09 g/L, ενώ από τη 3η ημέρα και έπειτα η μείωση σε σακχαρόζη ήταν πιο απότομη, φτάνοντας την 7η ημέρα στην συγκέντρωση των 0,16 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε ελάττωση στη συγκέντρωση καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης, με τα αρχικά 284,43 mg/L να μειώνονται στα 73,14 mg/L κατά το τέλος της ζύμωσης. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται κατά την 3η ημέρα της επώασης, όπου και η συγκέντρωση σε σάκχαρο είχε ελαττωθεί στα 0,74 g/L, ενώ η συγκέντρωση σε ανόργανο φώσφορο και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων ήταν στα 176,47 και 37,88 mg/L, αντίστοιχα. Στο γράφημα 3.28 παρουσιάζονται μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε σακχαρόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.29 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της σακχαρόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

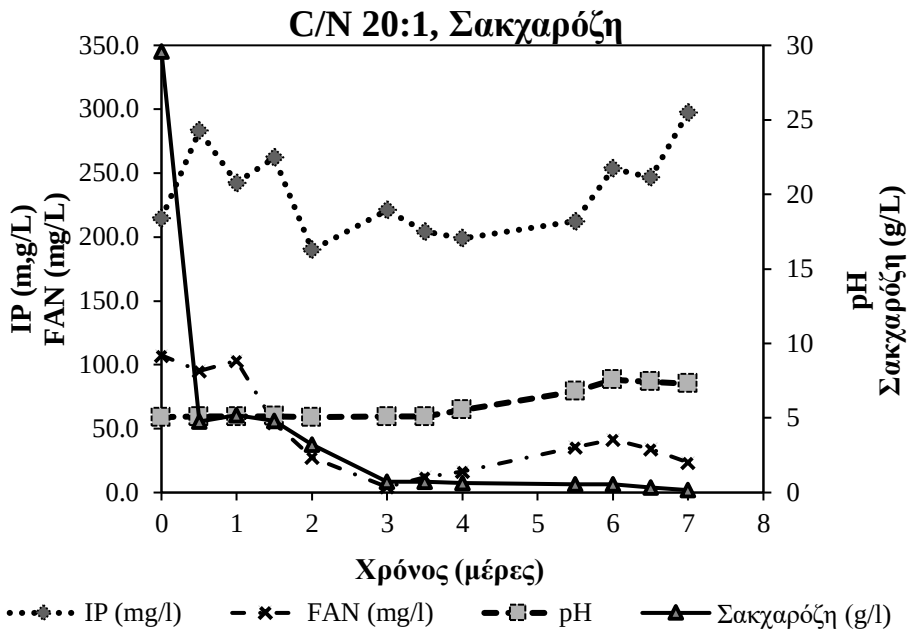


Γράφημα 3.28 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 10:1

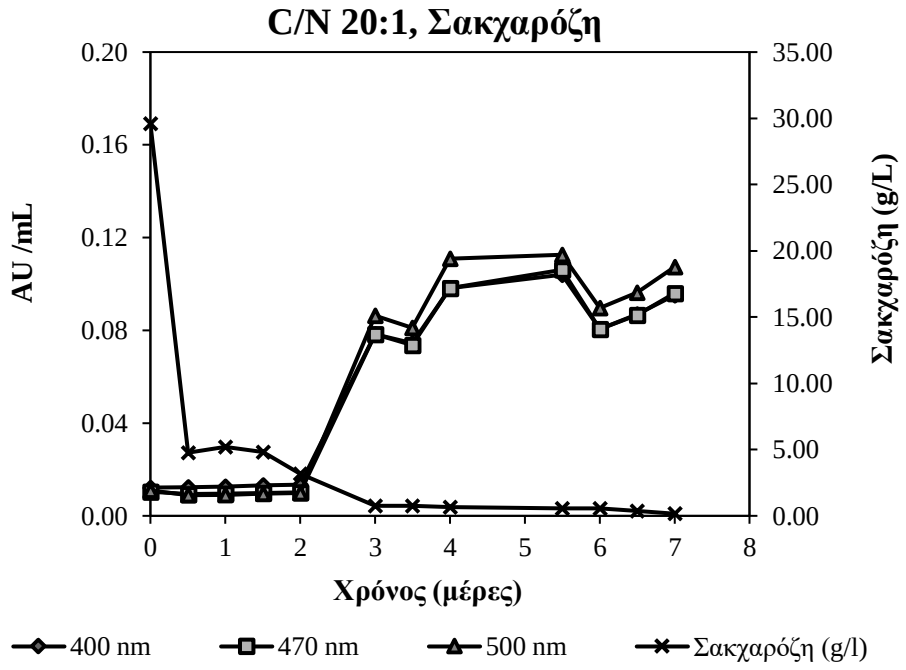


Γράφημα 3.29 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 10:1

Στην αναλογία 20:1 με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, επίσης παρατηρήθηκε ότι το σάκχαρο είχε καταναλωθεί όλο σχεδόν από τον μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 29,59 g/L, την 1^{η} ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί στα 5,20 g/L, ενώ την 7^{η} η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη ήταν στα 0,16 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε ελάττωση στη συγκέντρωση μέχρι και την 3^{η} ημέρα της επώασης, φτάνοντας τα 4,31 mg/L, από τα αρχικά 107,43 mg/L, ενώ από την 4^{η} ημέρα και μέχρι την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης η συγκέντρωση σε άζωτο παρουσίασε, τόσο ελαττώσεις, όσο και αυξήσεις. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται κατά την 2^{η} ημέρα της επώασης, όπου και η συγκέντρωση σε σάκχαρο είχε ελαττωθεί στα 3,20 g/L και η τιμή του αζώτου ήταν στα 27,57 mg/L. Στο γράφημα 3.30 παρουσιάζονται μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε σακχαρόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.31 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της σακχαρόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

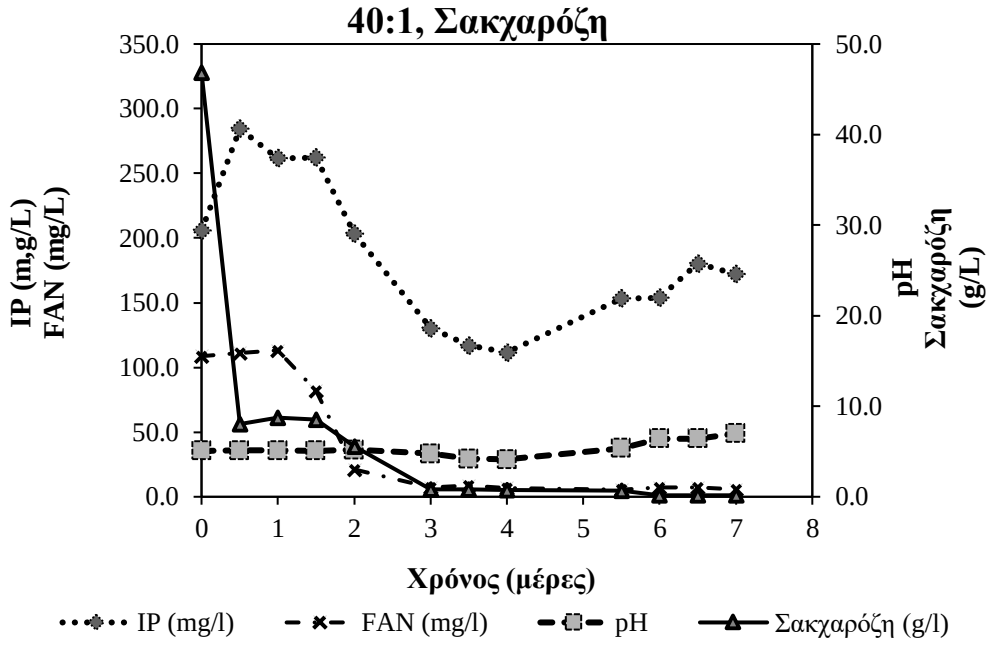


Γράφημα 3.30 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 20:1

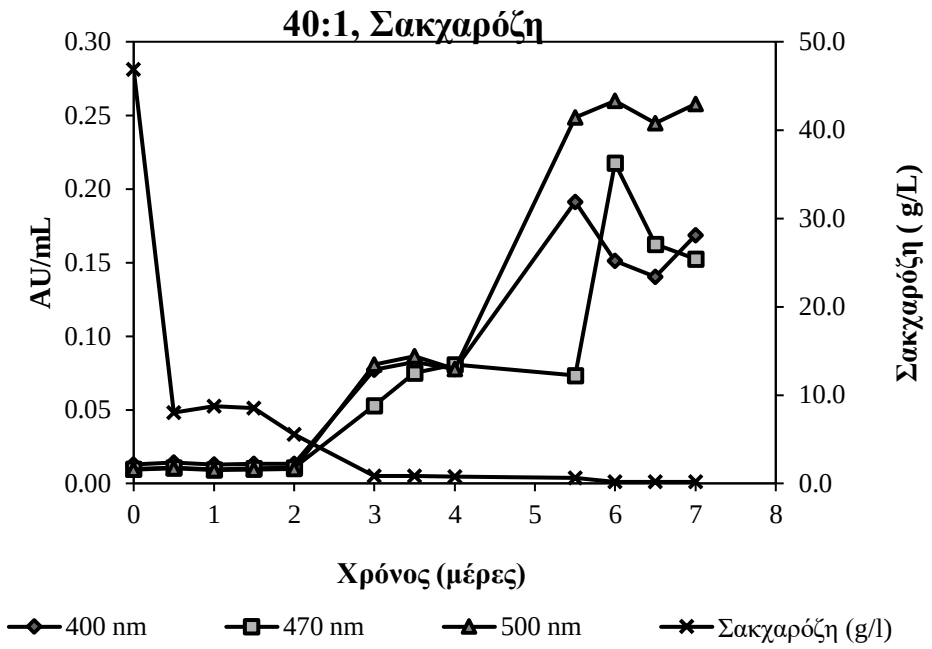


Γράφημα 3.31 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 20:1

Στην αναλογία 40:1 με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, παρατηρήθηκε ότι το σάκχαρο, όπως και στις προηγούμενες αναλογίες, είχε καταναλωθεί από τον μύκητα σχεδόν εξ' ολοκλήρου. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 46,84 g/L, την 1η ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί στα 8,77 g/L, ενώ από τη 3η ημέρα και έπειτα η μείωση σε σακχαρόζη ήταν πιο απότομη, φτάνοντας την 7η ημέρα στην συγκέντρωση των 0,16 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε ελάττωση στη συγκέντρωση καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης, με τα αρχικά 108,87 mg/L να μειώνονται στα 5,75 mg/L κατά το τέλος της ζύμωσης. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται κατά την 2η ημέρα της επώασης, όπου και η συγκέντρωση σε σάκχαρο είχε ελαττωθεί στα 5,55 g/L και η τιμή σε άζωτο είχε διαμορφωθεί στα 20,86 mg/L. Στο γράφημα 3.32 παρουσιάζονται μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε σακχαρόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.33 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της σακχαρόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

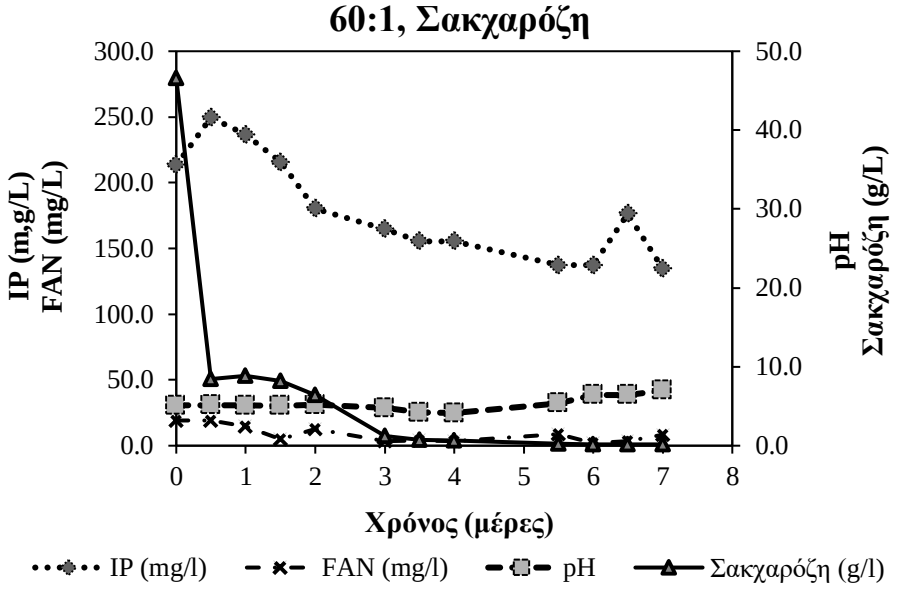


Γράφημα 3.32 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 40:1

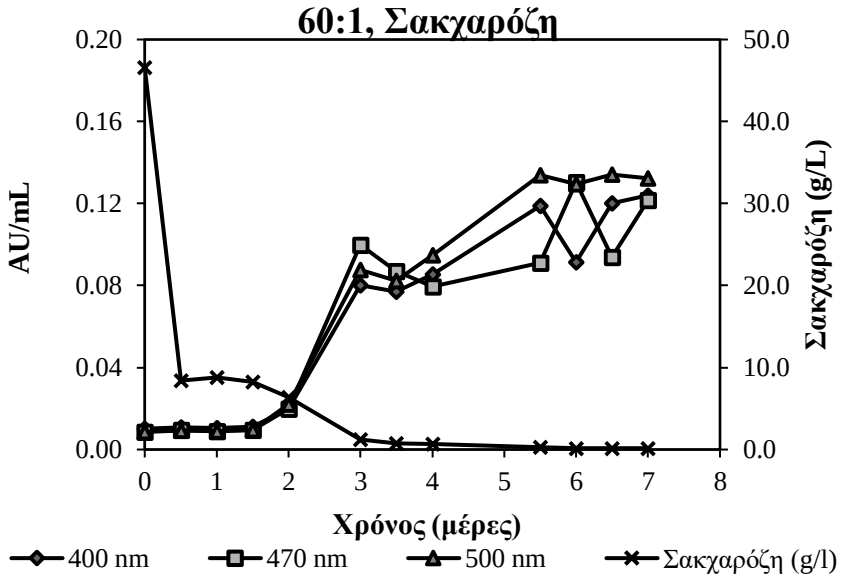


Γράφημα 3.33 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 40:1

Στην αναλογία 60:1 με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, παρατηρήθηκε ότι το σάκχαρο, όπως και στις προηγούμενες αναλογίες, είχε καταναλωθεί από τον μύκητα σχεδόν όλο. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 46,55 g/L, την 1^{η} ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί στα 8,81 g/L, ενώ από τη 3^{η} ημέρα και έπειτα η μείωση σε σακχαρόζη ήταν πιο απότομη, φτάνοντας την 7^{η} ημέρα στην συγκέντρωση των 0,16 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε ελάττωση στη συγκέντρωση καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης, με τα αρχικά 19,17 mg/L να μειώνονται στα 8,14 mg/L κατά το τέλος της ζύμωσης. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται κατά την 2^{η} ημέρα της επώασης, όπου και η συγκέντρωση σε σάκχαρο είχε ελαττωθεί στα 6,38 g/L και η τιμή σε άζωτο είχε διαμορφωθεί στα 12,70 mg/L. Στο γράφημα 3.34 παρουσιάζονται μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε σακχαρόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.35 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της σακχαρόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

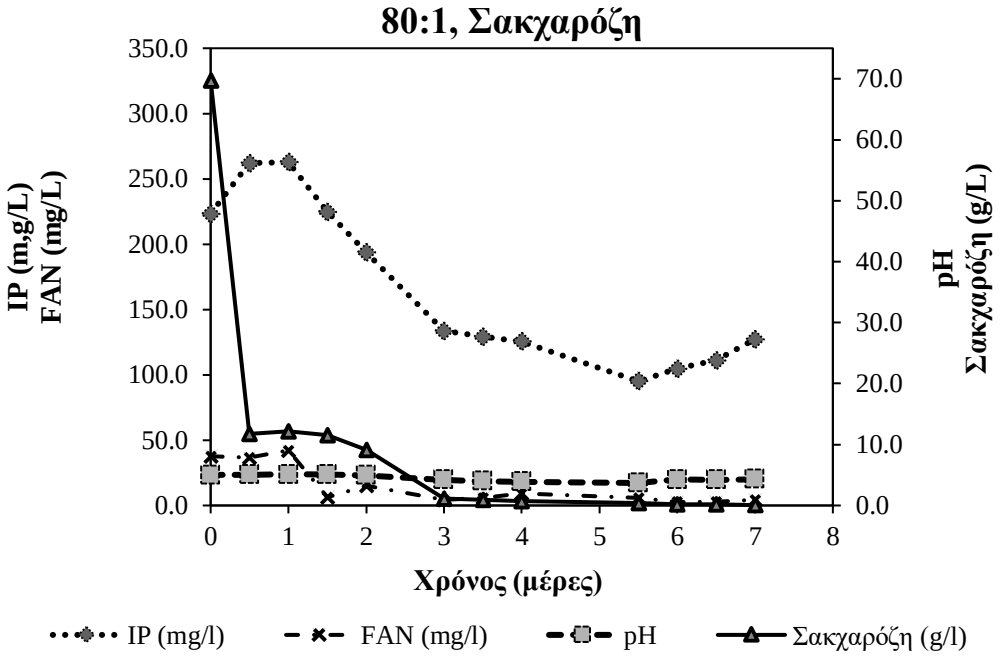


Γράφημα 3.34 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 60:1

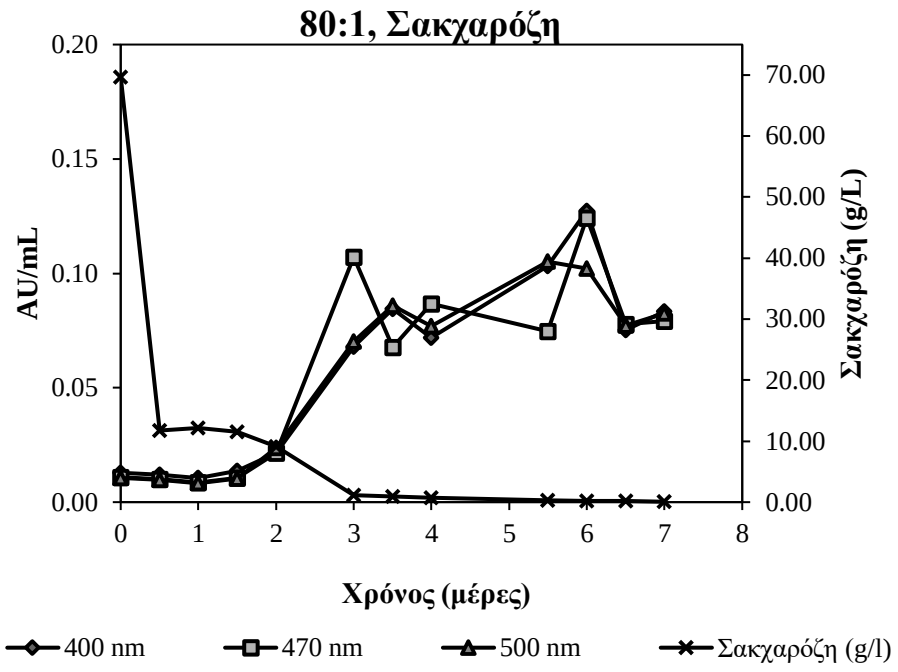


Γράφημα 3.35 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 60:1

Στην τελευταία αναλογία με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, 80:1, παρατηρήθηκε ότι το σάκχαρο καταναλώθηκε από το μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 69,71 g/L, την 1η ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί στα 11,74 g/L, ενώ από τη 3η ημέρα και έπειτα η μείωση σε σακχαρόζη ήταν πιο απότομη, φτάνοντας την 7η ημέρα στην συγκέντρωση των 0,07 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε ελάττωση στη συγκέντρωση, με τα αρχικά 37,38 mg/L να μειώνονται στα 4,31 mg/L κατά το τέλος της ζύμωσης. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται κατά την 2η ημέρα της επώασης, όπου και η συγκέντρωση σε σάκχαρο είχε ελαττωθεί στα 9,12 g/L και η τιμή σε άζωτο είχε διαμορφωθεί στα 15,34 mg/L. Στο γράφημα 3.36 παρουσιάζονται μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε σακχαρόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.37 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της σακχαρόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

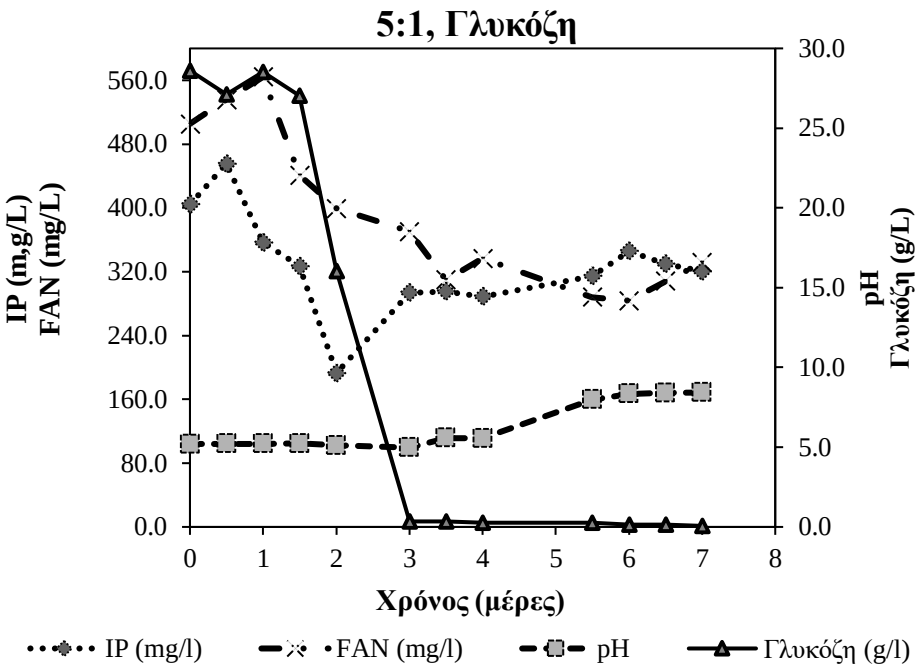


Γράφημα 3.36 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 80:1

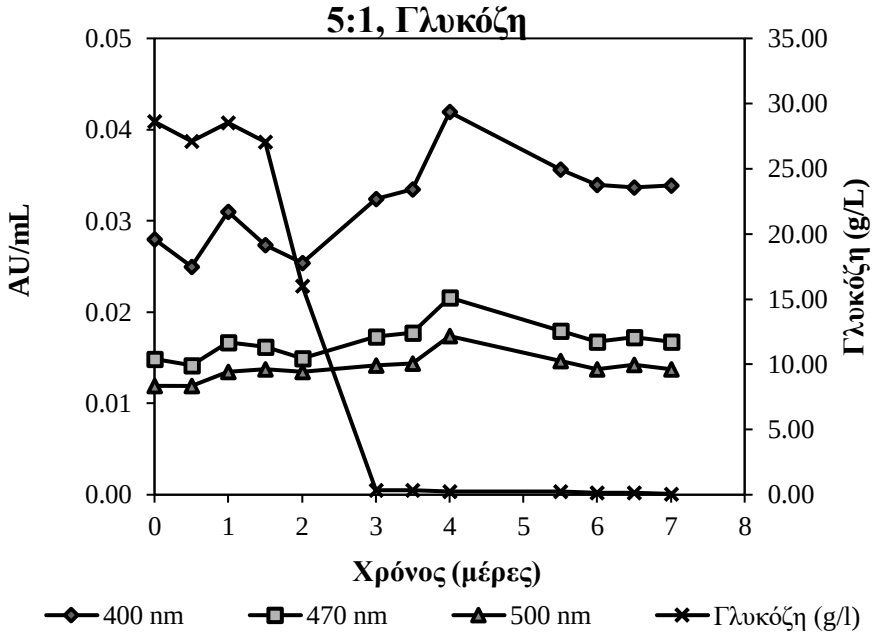


Γράφημα 3.37 Απεικόνιση της κατανάλωσης της σακχαρόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 80:1

Στις υγρές καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και στις οποίες η αναλογία C/N ήταν 5:1, παρατηρήθηκε η κατανάλωση του σακχάρου από το μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 28,61 g/L, την 2^{η} ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί στα 16,03 g/L, ενώ από τη 3^{η} ημέρα και έπειτα η μείωση σε γλυκόζη ήταν πιο απότομη, φτάνοντας την 7^{η} ημέρα στην συγκέντρωση των 0,07 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε γενικά ελάττωση στη συγκέντρωση, με τα αρχικά 505,09 mg/L να μειώνονται στα 331,46 mg/L κατά το τέλος της ζύμωσης. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής δεν ήταν ιδιαίτερη επιτυχής, με τις απορροφήσεις/mL να σημειώνουν χαμηλές τιμές. Στο γράφημα 3.38 παρουσιάζονται μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε φρουκτόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.39 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της φρουκτόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

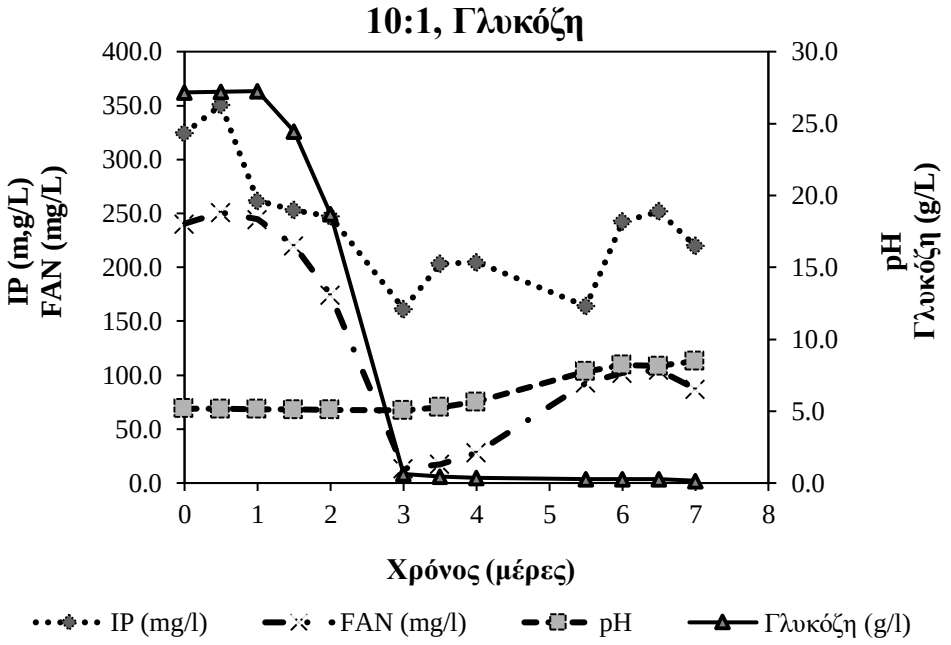


Γράφημα 3.38 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 5:1

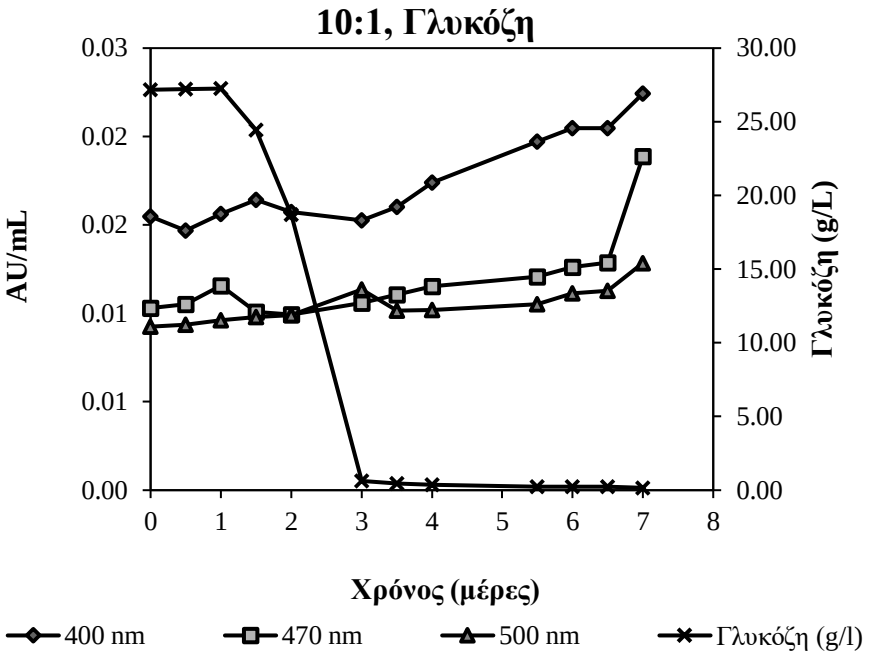


Γράφημα 3.39 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 5:1

Στην αναλογία 10:1 με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, παρατηρήθηκε, όπως και στην 5:1, κατανάλωση του σακχάρου από το μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 27,18 g/L, την 3η ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί στα 0,64 g/L, φτάνοντας την 7η ημέρα στην συγκέντρωση των 0,16 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε ελάττωση στη συγκέντρωση μέχρι και την 3η ημέρα της επώασης, με τα αρχικά 240,30 mg/L να μειώνονται στα 13,42 mg/L. Από την 4η μέχρι και την 6η ημέρα η συγκέντρωση σε άζωτο αυξήθηκε, λαμβάνοντας τιμές 28,05 και 102,16 mg/L, αντίστοιχα, ενώ στα 87,05 mg/L ήταν η συγκέντρωση κατά την τελευταία ημέρα της επώασης. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής δεν ήταν ιδιαίτερη επιτυχής, όπως συνέβη και στην αναλογία 5:1, με τις απορροφήσεις/mL να σημειώνουν χαμηλές τιμές. Στο γράφημα 3.40 παρουσιάζονται μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε σακχαρόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.41 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της σακχαρόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

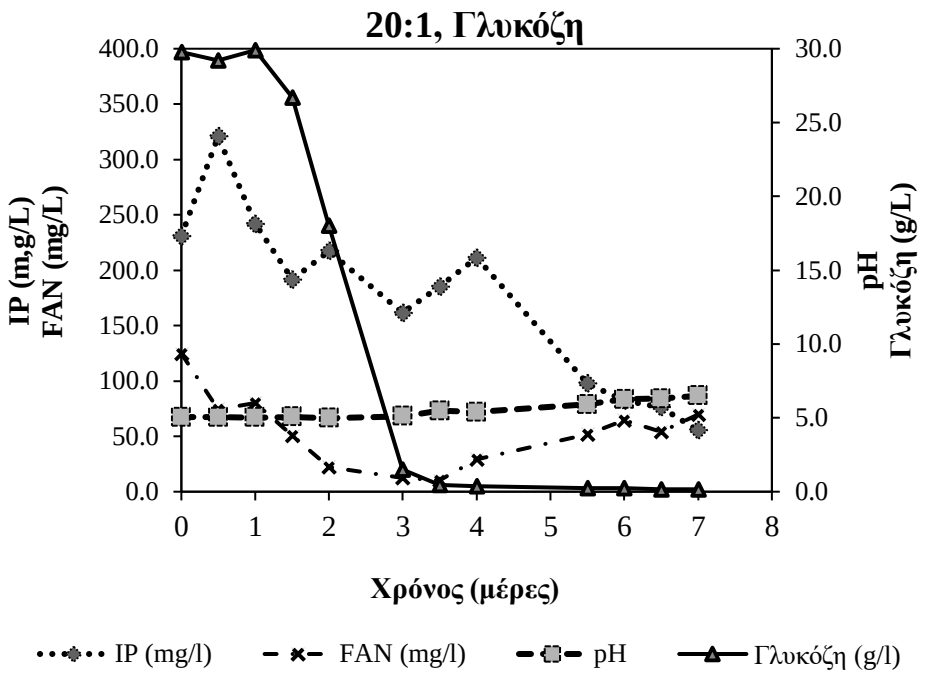


Γράφημα 3.40 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 10:1

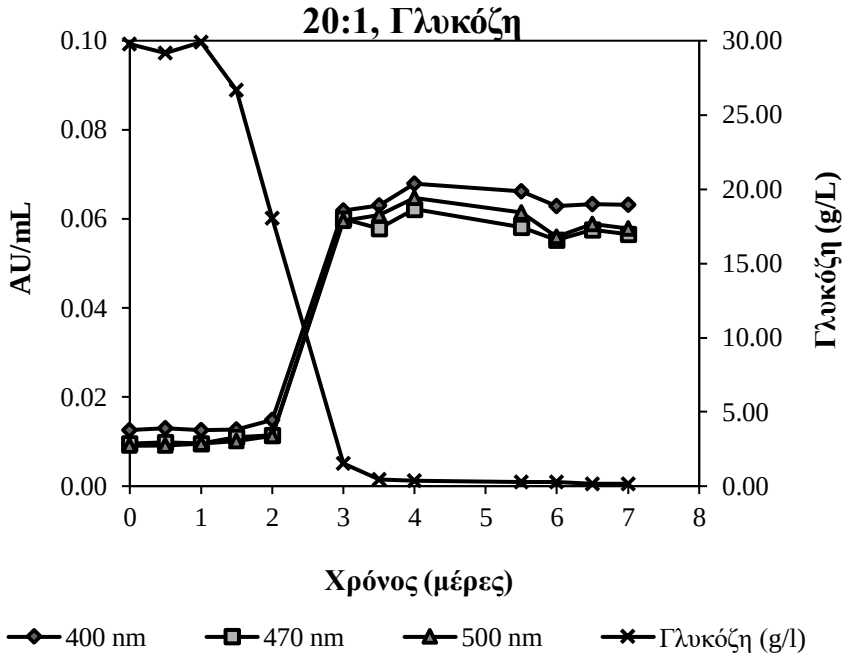


Γράφημα 3.41 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 10:1

Στην αναλογία 20:1 με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, επίσης παρατηρήθηκε ότι το σάκχαρο είχε καταναλωθεί όλο σχεδόν από τον μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 29,76 g/L, την 3η ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί στα 1,51 g/L, ενώ την 7η η περιεκτικότητα σε γλυκόζη ήταν στα 0,16 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε ελάττωση στη συγκέντρωση μέχρι και την 3η ημέρα της επώασης, φτάνοντας τα 10,30 mg/L, από τα αρχικά 124,70 mg/L, ενώ από την 4η ημέρα και μέχρι την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης η συγκέντρωση σε άζωτο παρουσίασε, τόσο ελαττώσεις, όσο και αυξήσεις, καταγράφοντας την περιεκτικότητα κατά το τέλος της ζύμωσης, των 69,78 mg/L. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται κατά την 2η ημέρα της επώασης, όπου και η συγκέντρωση σε σάκχαρο είχε ελαττωθεί στα 18,03 g/L και η τιμή του αζώτου ήταν στα 12,46 mg/L. Στο γράφημα 3.42 παρουσιάζονται μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε γλυκόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.43 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της γλυκόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

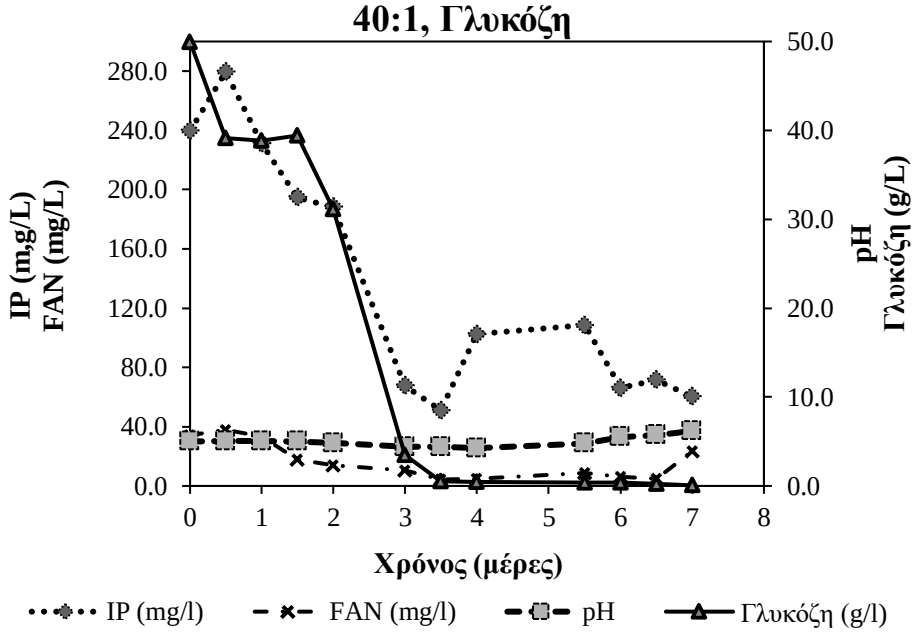


Γράφημα 3.42 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 20:1

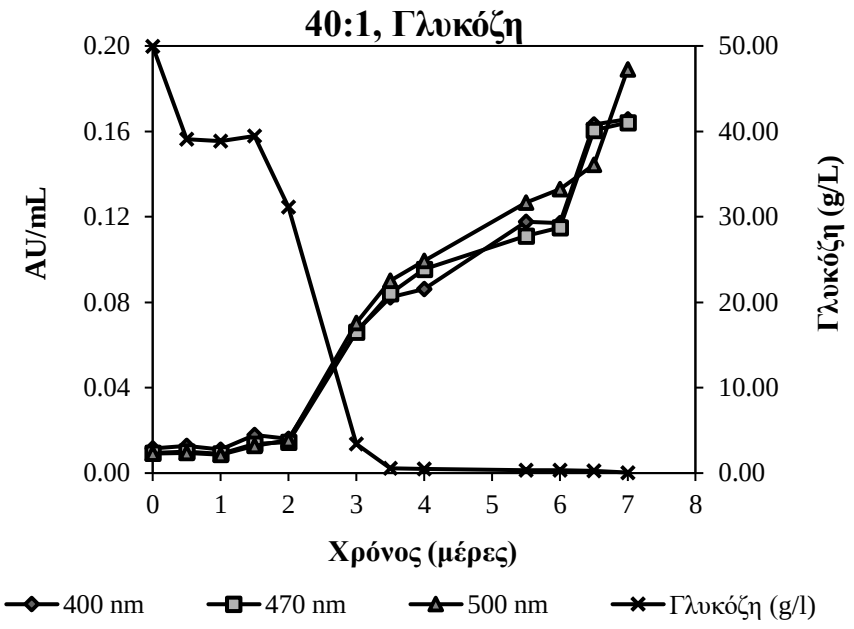


Γράφημα 3.43 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 20:1

Στην αναλογία 40:1 με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, παρατηρήθηκε η σχεδόν εξ' ολοκλήρου κατανάλωση του σακχάρου, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 49,97 g/L, την 1η ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί στα 38,87 g/L, ενώ από τη 3η ημέρα και έπειτα η μείωση σε γλυκόζη ήταν πιο απότομη, φτάνοντας την 7η ημέρα στην συγκέντρωση των 0,07 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε ελάττωση στη συγκέντρωση, μέχρι και την 3η ημέρα της επώασης, με τα αρχικά 34,04 mg/L να μειώνονται στα 4,31 mg/L. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε μια αύξηση της συγκέντρωση του αζώτου, καταγράφοντας κατά την 7η ημέρα την τιμή των 23,49 mg/L. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται κατά την 2η ημέρα της επώασης, όπου και η συγκέντρωση σε σάκχαρο είχε ελαττωθεί στα 31,11 g/L και η τιμή σε άζωτο είχε διαμορφωθεί στα 14,14 mg/L. Στο γράφημα 3.44 παρουσιάζονται μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε γλυκόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.45 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της γλυκόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.

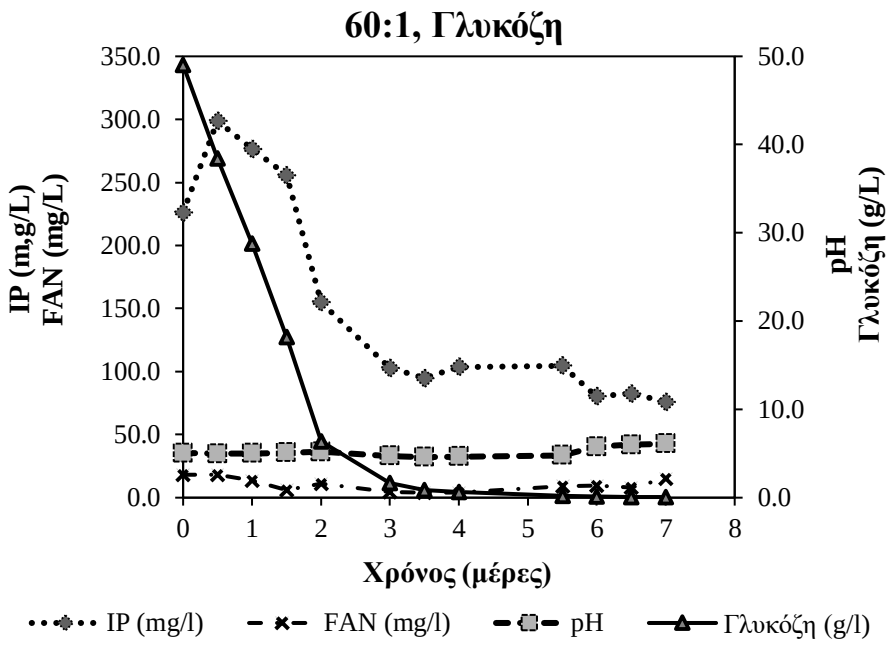


Γράφημα 3.44 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 40:1

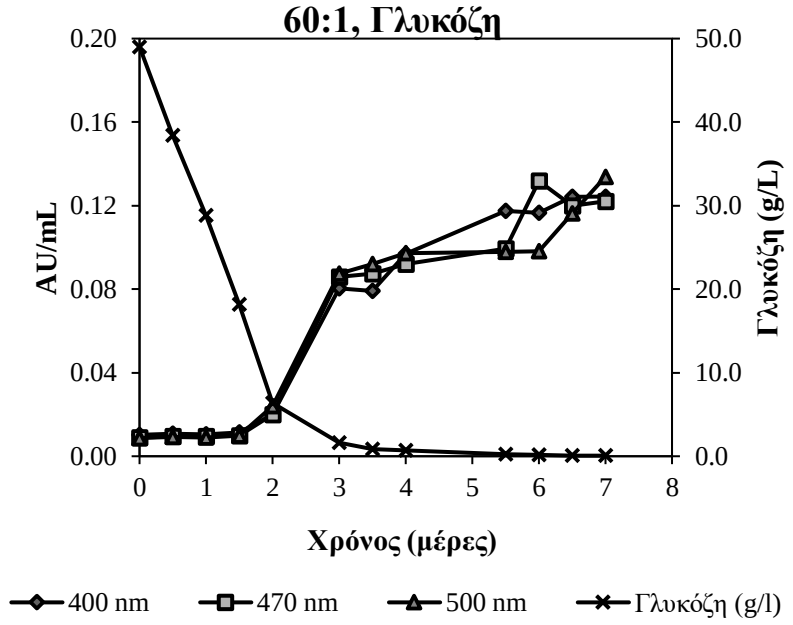


Γράφημα 3.45 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 40:1

Στην αναλογία 60:1 με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, παρατηρήθηκε ότι το σάκχαρο, όπως και στις προηγούμενες αναλογίες, είχε καταναλωθεί από τον μύκητα σχεδόν όλο. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 49,02 g/L, την 2^{η} ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί στα 6,37 g/L, ενώ την 7^{η} ημέρα η περιεκτικότητα καταγράφηκε στα 0,07 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε ελάττωση στη συγκέντρωση μέχρι και την 4^{η} ημέρα, με τα αρχικά 18,16 mg/L να μειώνονται στα 4,06 mg/L, ενώ κατά το τέλος της ζύμωσης η περιεκτικότητα σε άζωτο αυξήθηκε στα 15,32 mg/L. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται κατά την 2^{η} ημέρα της επώασης, όπου και η συγκέντρωση σε σάκχαρο είχε ελαττωθεί στα 6,37 g/L και η τιμή σε άζωτο είχε διαμορφωθεί στα 11,20 mg/L. Στο γράφημα 3.46 παρουσιάζονται μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε γλυκόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.47 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της γλυκόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.



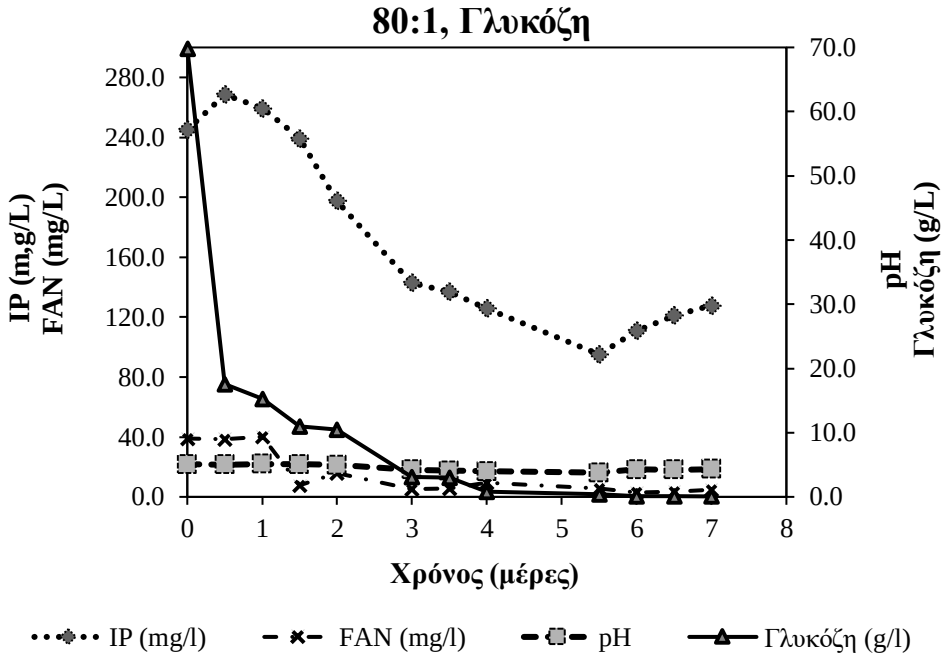
Γράφημα 3.46 Απεικόνιση της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 60:1



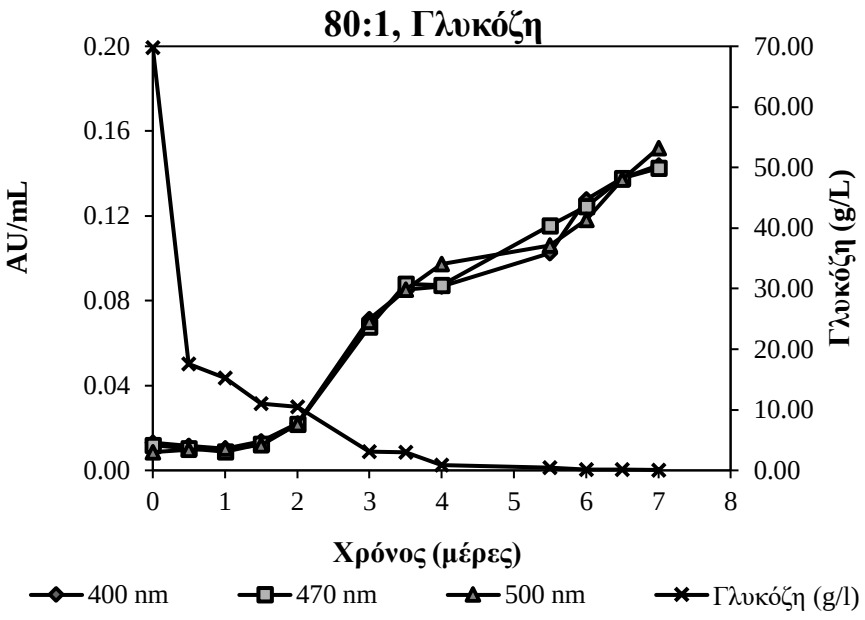
Γράφημα 3.47 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 60:1

Στην τελευταία αναλογία με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, 80:1, παρατηρήθηκε ότι το σάκχαρο καταναλώθηκε από το μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, από τα αρχικά 69,81 g/L, την 3η ημέρα της επώασης η συγκέντρωση των σακχάρων είχε ελαττωθεί

στα 3,14 g/L, ενώ από τη 3η ημέρα και έπειτα η μείωση σε σακχαρόζη ήταν πιο απότομη, φτάνοντας την 7η ημέρα στην συγκέντρωση των 0,07 g/L. Από την άλλη, στην ανάλυση σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) διαπιστώθηκε ελάττωση στη συγκέντρωση, με τα αρχικά 38,92 mg/L να μειώνονται στα 4,82 mg/L κατά το τέλος της ζύμωσης. Τέλος, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής ξεκίνησε να παρατηρείται κατά την 2η ημέρα της επώασης, όπου και η συγκέντρωση σε σάκχαρο είχε ελαττωθεί στα 10,52 g/L και η τιμή σε άζωτο είχε διαμορφωθεί στα 15,65 mg/L. Στο γράφημα 3.48 παρουσιάζονται μεταβολές στις συγκεντρώσεις σε σακχαρόζη και ανόργανο φώσφορο, η τιμή του pH, ενώ στο 3.49 φαίνεται η κατανάλωση του σακχάρου της σακχαρόζης και οι απορροφήσεις/mL των παραγόμενων χρωστικών στα 400, 470 και 500 nm.



Γράφημα 3.48 Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/L) και της τιμής pH, καθώς και της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), στις υγρές καλλιέργειες με αναλογία C/N 80:1



Γράφημα 3.49 Απεικόνιση της κατανάλωσης της γλυκόζης (g/L) από το μύκητα και ταυτόχρονη ένδειξη των απορροφήσεων/mL της παραγόμενης χρωστικής στα 400, 470 και 500 nm, στις υγρές με αναλογία C/N 80:1

Τόσο στις καλλιέργειες στις οποίες ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η σακχαρόζη, όσο και σε αυτές όπου χρησιμοποιήθηκε η γλυκόζη, η παραγωγικότητα των ζυμώσεων ήταν μεγαλύτερη στην αναλογία 40:1. Ειδικότερα, για τα 500 nm, η παραγωγικότητα για το σάκχαρο της σακχαρόζης ήταν στα 0,037 AU/mL/μέρες ζύμωσης, ενώ 0,027 ήταν η αντίστοιχη τιμή για τη γλυκόζη. Όσον αφορά στις χαμηλότερες τιμές της παραγωγικότητας, αυτές παρατηρήθηκαν στην αναλογία 5:1 και για τα δύο σάκχαρα. Τέλος, αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για την απόδοση των ζυμώσεων, όπου η αναλογία 40:1 και στα τρία μήκη κύματος, κατείχε τις υψηλότερες τιμές, τόσο για τη σακχαρόζη, όσο και για τη γλυκόζη. Συγκεκριμένα, κατά την 7^{η} ημέρα της επώασης, η απόδοση της ζύμωσης με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη έλαβε τις τιμές 1,04, 094 και 1,60 AU/mL/g σακχάρου, για τα 400, 470 και 500 nm, αντίστοιχα. Αντίθετα, για τη γλυκόζη, οι αντίστοιχες ληφθείσες τιμές βρέθηκαν στα 2,55, 2,52 και 2,91 AU/mL/g σακχάρου, για τα 400, 470 και 500 nm, αντίστοιχα, καθιστώντας την την αποδοτικότερη συνθήκη για την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή της εξωκυτταρικής χρωστικής. Στον πίνακα 3.22 παρουσιάζεται η παραγωγικότητα της ζύμωσης για τα εμπορικά σάκχαρα της σακχαρόζη και της γλυκόζης, εκφρασμένη σε AU/mL/μέρες ζύμωσης, ενώ ο πίνακας

3.23 απαρτίζεται από την απόδοση της ζύμωσης, εκφρασμένη σε AU/mL/g σακχάρου.

Πίνακας 3. 22 Παραγωγικότητα ζύμωσης για την σακχαρόζη και τη γλυκόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t= 7 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N

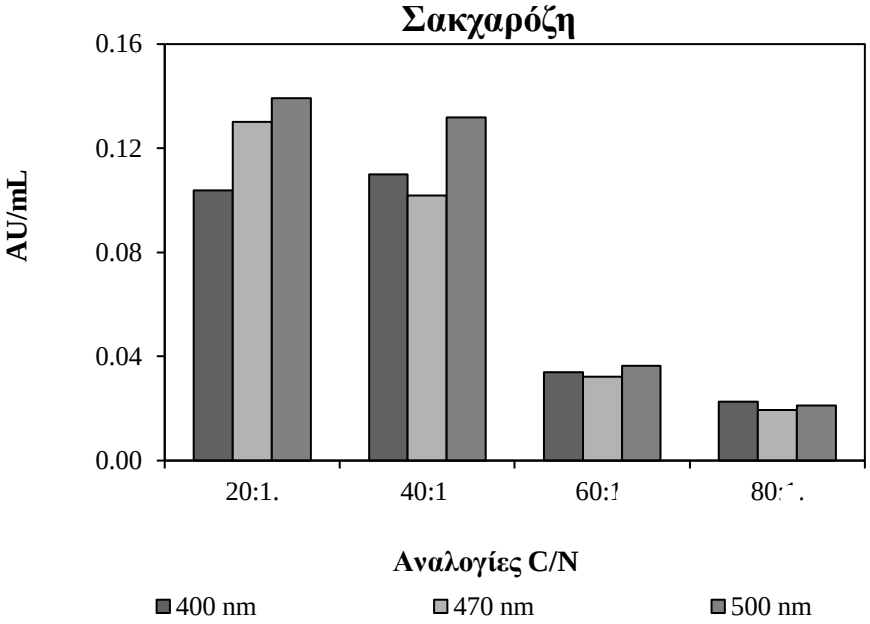
Παραγωγικότητα (AU/mL / μέρες ζύμωσης)				
Σάκχαρο	**Αναλογία C/N**	**400 nm**	**470 nm**	**500 nm**
Σακχαρόζη	**5:1**	0,008	0,004	0,003
	10:1	0,015	0,016	0,018
	20:1	0,015	0,015	0,016
	40:1	0,027	0,031	0,037
	60:1	0,018	0,019	0,019
	80:1	0,018	0,018	0,015
Γλυκόζη	**5:1**	0,006	0,003	0,002
	10:1	0,004	0,003	0,002
	20:1	0,010	0,009	0,009
	40:1	0,024	0,023	0,027
	60:1	0,018	0,017	0,019
	80:1	0,021	0,020	0,022

Πίνακας 3. 23 Απόδοση ζύμωσης για την σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, στα μήκη κύματος 400, 470 και 500 nm, για χρόνο t= 7 ημέρες, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N

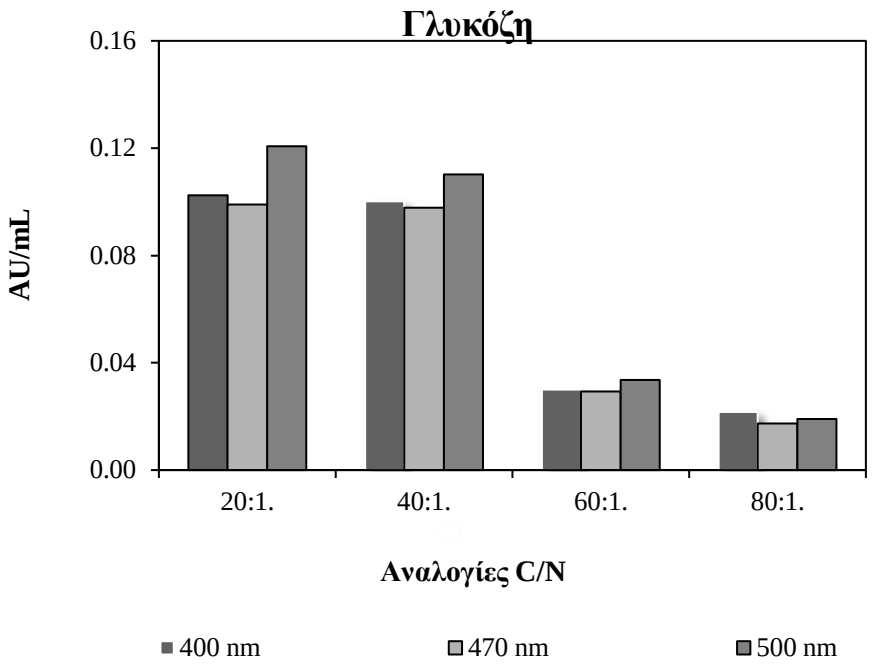
		Απόδοση (AU/mL/g καταναλωθέντων σακχάρων)		
Σάκχαρο	**Αναλογία C/N**	**400 nm**	**470 nm**	**500 nm**
Σακχαρόζη	**5:1**	0,83	0,40	0,32
	10:1	0,58	0,57	0,65
	20:1	0,59	0,59	0,66
	40:1	1,04	0,94	1,60
	60:1	0,77	0,75	0,82
	80:1	1,28	1,22	1,27
Γλυκόζη	**5:1**	0,52	0,26	0,21
	10:1	0,17	0,14	0,10
	20:1	0,39	0,35	0,36
	40:1	2,55	2,52	2,91
	60:1	1,78	2,52	1,91
	80:1	2,05	2,04	2,17

Αφού ο χρόνος επώασης παρήλθε, ακολούθησαν οι εκχυλίσεις των παραχθεισών χρωστικών, από το υπερκείμενο και τη βιομάζα. Για την εκχύλιση των εξωκυτταρικών χρωστικών χρησιμοποιήθηκε η καλύτερη αναλογία που βρέθηκε κατά την εκχύλιση της εν λόγω χρωστικής από τις υγρές καλλιέργειες με διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης και ρυθμιστικό διάλυμα. Συγκεκριμένα, η αναλογία οξικού αιθυλεστέρα:2-προπανόλης 9:1 συνέβαλε καταλυτικά στην εκχύλιση της βιογενούς χρωστικής. Οι αναλογίες από τις οποίες εκχυλίστηκε η εξωκυτταρική χρωστική με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, αλλά και τη γλυκόζη, ήταν οι 10:1, 20:1, 40:1, 60:1 και 80:1. Η αναλογία στην οποία εκχυλίστηκε περισσότερο η εξωκυτταρική χρωστική, δίνοντας τις μεγαλύτερες απορροφήσεις/mL, ήταν η 20:1, τόσο στην υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, όσο και στην πηγή άνθρακα της γλυκόζης. Ακολούθησε η αναλογία 40:1 και για τα δύο σάκχαρα επίσης, ενώ οι αναλογίες στις οποίες καταγράφηκαν οι χαμηλότερες τιμές απορρόφησης, ήταν οι

60:1 και 80:1. Για τις αναλογίες 5:1 και 10:1 δεν πραγματοποιήθηκε κάποια εκχύλιση, καθώς δεν παρατηρήθηκε παραγωγή χρωστικής σε όλη τη διάρκεια του χρόνου επώασης. Στα γραφήματα 3.50 και 3.51 απεικονίζονται οι απορροφήσεις των εκχυλιζόμενων εξωκυτταρικών χρωστικών, για τις προαναφερθείσες αναλογίες, των καλλιεργειών με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη και τη γλυκόζη, αντίστοιχα.

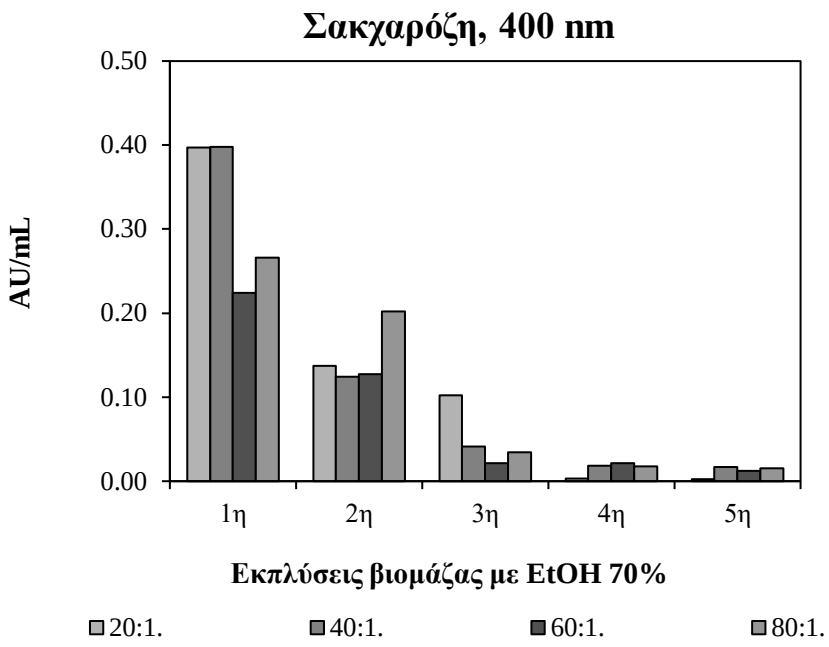


Γράφημα 3.50 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων εξωκυτταρικών χρωστικών, στα 400, 470 και 500 nm, στην αναλογία 1:9 οξικού αιθυλεστέρα και 2-προπανόλης, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N και πηγή άθρακα τη σακχαρόζη

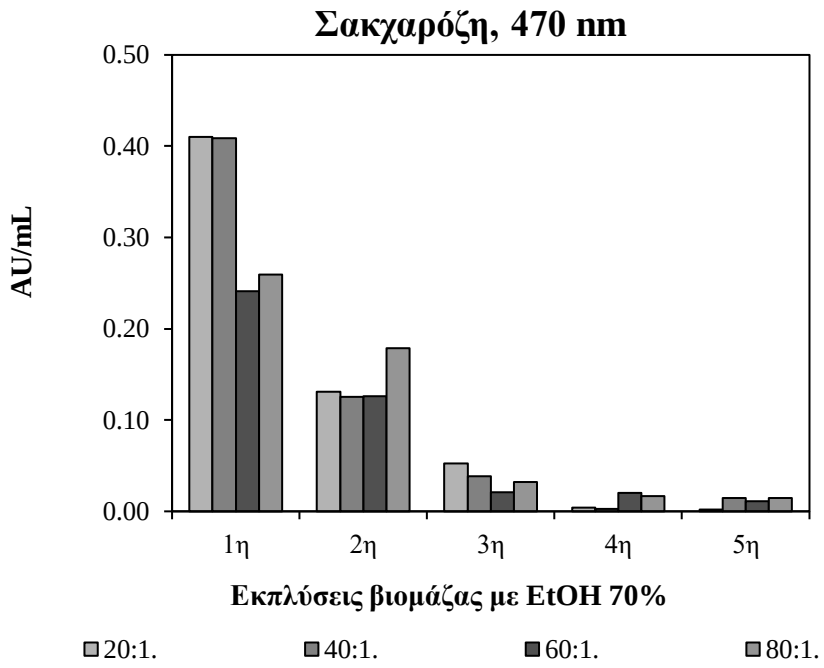


Γράφημα 3.51 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων εξωκυτταρικών χρωστικών, στα 400, 470 και 500 nm, στην αναλογία 1:9 οξικού αιθυλεστέρα και 2 - προπανόλης, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N και πηγή άθρακα τη γλυκόζη

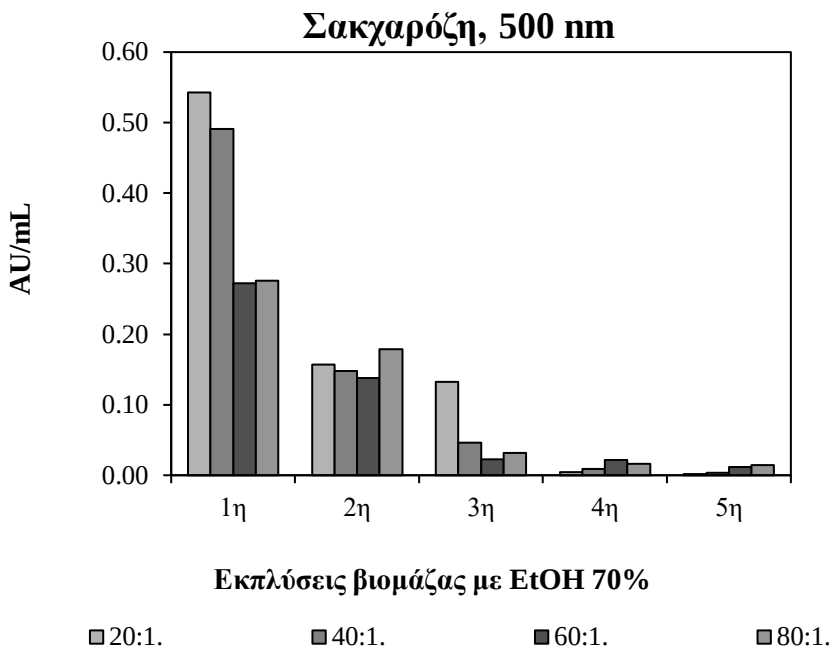
Εξίσου επιτυχής ήταν και η εκχύλιση της ενδοκυτταρικής, από τη βιομάζα, χρωστικής. Όσο η έκπλυση της βιομάζας με την EtOH πραγματοποιούταν, τόσο μικρότερη ήταν και η τιμή της μέτρησης του χρώματος, γεγονός που οδηγούσε στο συμπέρασμα της άρτιας και επιτυχούς εκχύλισης της χρωστικής. Η αναλογία στην οποία πραγματοποιήθηκε η περισσότερη έκπλυση της βιομάζας στις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, ήταν η 20:1, ενώ η 40:1 ήταν η αναλογία με τις μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης των εκπλύσεων, στις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. Από την 3^{η} κατά σειρά έκπλυση της βιομάζας στις διάφορες αναλογίες και των δύο σακχάρων, οι απορροφήσεις που καταγράφηκαν, ήταν χαμηλές, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως όλες οι βιομάζες εκπλύθηκαν επιτυχώς, παραλαμβάνοντας όλη την ενδοκυτταρική χρωστική. Στα γραφήματα 3.52, 3.53, 3.54 και 3.55, 3.56, 3.57 που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι απορροφήσεις των διαδοχικών εκπλύσεων με την EtOH στις βιομάζες για τα σάκχαρα της σακχαρόζης και της γλυκόζης, στα τρία διαφορετικά μήκη κύματος, αντίστοιχα.



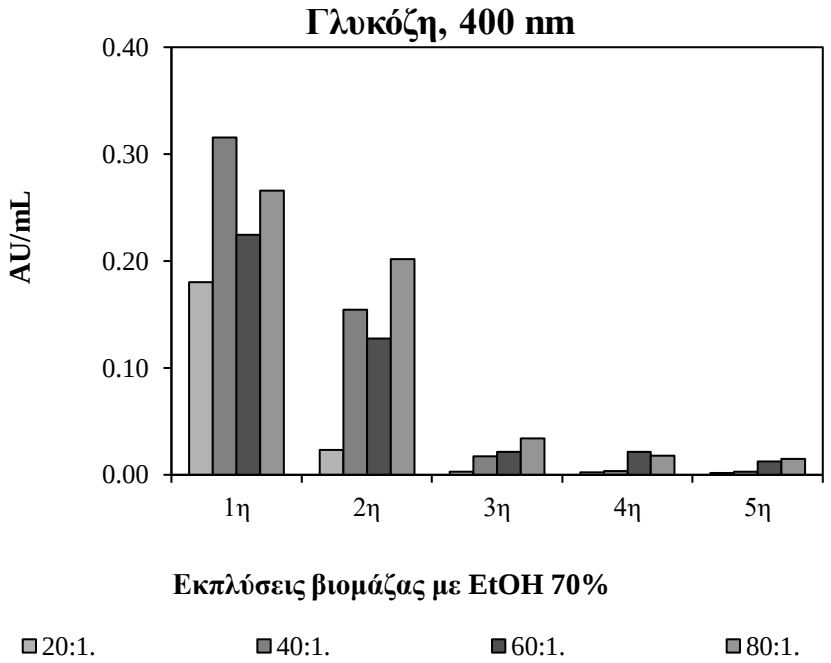
Γράφημα 3.52 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων / mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, στα 400 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N



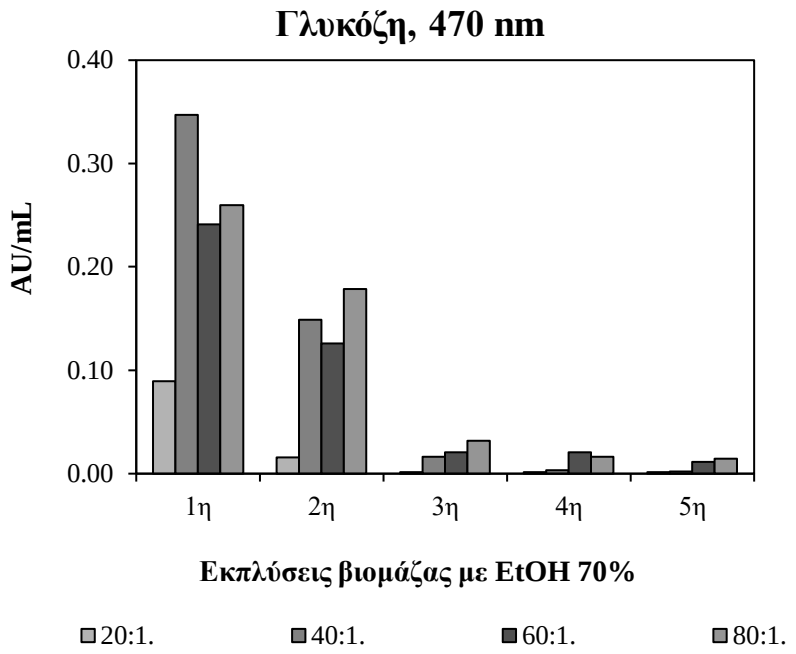
Γράφημα 3.53 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, στα 470 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N



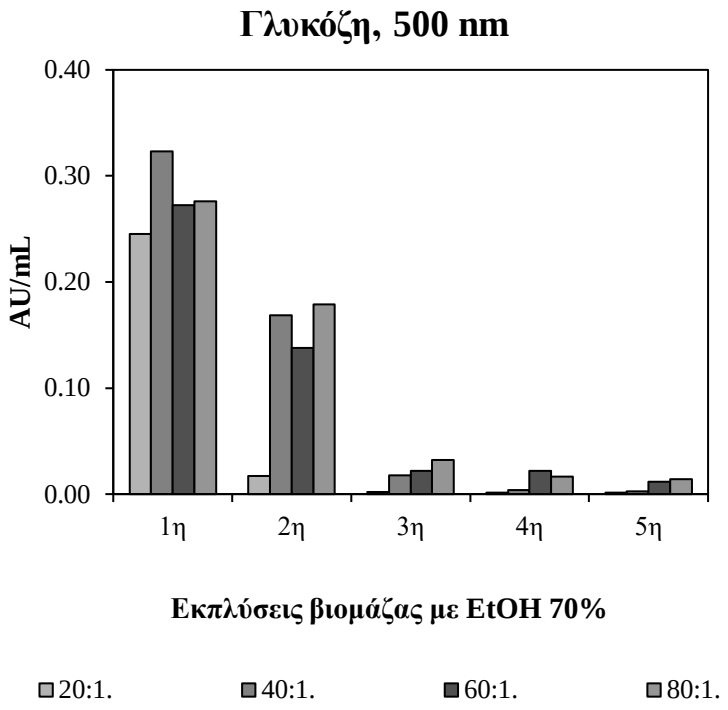
Γράφημα 3.54 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, στα 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N



Γράφημα 3.55 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη στα 400 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N



Γράφημα 3.56 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη στα 470 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N



Γράφημα 3.57 Συγκριτική απεικόνιση απορροφήσεων/mL εκχυλιζόμενων, με διαδοχικές εκπλύσεις της βιομάζας με EtOH 70 %, ενδοκυτταρικών χρωστικών, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη στα 500 nm, στις υγρές καλλιέργειες με διάφορες αναλογίες C/N

3.3.1.4 Φυσικά σάκχαρα του μήλου, στην αναλογία C/N 20:1

Στις υγρές καλλιέργειες στις οποίες ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο της εκχύλισης των σακχάρων από τον πολτό του μήλου, δεν συνέβαλε στην επιτυχή παραγωγή της επιθυμητής χρωστικής. Τα αρχικά 30 g/L συνολικών σακχάρων της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης, έλαβαν αύξουσες τιμές συγκέντρωσης, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα της συμπύκνωσης του υποστρώματος, ενώ απούσα ήταν και η παραγόμενη, από τον μικροοργανισμό, βιομάζα. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τις υγρές καλλιέργειες με τα εμπορικά σάκχαρα της σακχαρόζης και της γλυκόζης, στην αναλογία 20:1, τα σάκχαρα του μήλου θα έπρεπε να είχαν καταναλωθεί από την 3^{η} ημέρας της επώασης, πράγμα το οποίο δεν συνέβη. Στον πίνακα 3.24 παρουσιάζονται οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις στα σάκχαρα της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης, καθώς επίσης και το σύνολο αυτών, από χρόνο t=0 έως 3 ημέρες επώασης, ενώ στο γράφημα εμφανίζεται η αύξηση στα συνολικά σάκχαρα που παρατηρήθηκε σε αυτό το χρόνο επώασης.

Πίνακας 3. 24 Συγκεντρώσεις της σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης, καθώς και το σύνολο αυτών στην υγρή καλλιέργεια με τα φυσικά σάκχαρα του μήλου, στην αναλογία C/N 20:1

Χρόνος (ημέρες)	Σακχαρόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Φρουκτόζη (g/L)	Σύνολο σακχάρων (g/L)
0	1,14	9,34	19,64	30,12
1	1,15	19,26	14,68	35,09
2	1,25	20,15	15,83	37,23
3	1,39	16,07	19,80	37,26

3.3.2 Στερεές καλλιέργειες

3.3.2.1 Φλούδες πορτοκαλιού

Μετά το πέρας δύο εβδομάδων επώασης, η χρωστική – στόχος δεν φάνηκε να παράχθηκε από το μύκητα. Ειδικότερα, ενώ ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε πλήρως στο αποτελούμενο από φλούδες πορτοκαλιού, υπόστρωμα, η παραγωγή της κόκκινης χρωστικής χαρακτηρίστηκε ως ανεπιτυχής.

3.3.3 Παραγωγή βιογενών χρωστικών μέσω μικροβιακών ζυμώσεων

Η τάση της εποχής για αντικατάσταση των συνθετικών χρωστικών από φυσικές, η εύκολη διαθεσιμότητα των αγροτοβιομηχανικών προϊόντων και η εύκολη παραγωγική τους διαδικασία έστρεψε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας προς την παραγωγή βιογενών χρωστικών ουσιών, χρωστικών δηλαδή παραγόμενων μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Τα εναπομείναντα κλάσματα από το βιοδιυλιστήριο του μήλου και του φλοιού πορτοκαλιού αποτέλεσαν τα θρεπτικά υποστρώματα για την ανάπτυξη του μύκητα σε υγρές και στερεές καλλιέργειες, αντίστοιχα. Η έναρξη των πειραμάτων βελτιστοποίησης των συνθηκών ανάπτυξης του *Penicillium purpurogenum* πραγματοποιήθηκε σε εμπορικά υποστρώματα. Το υπόστρωμα του Czapek συνέβαλε θετικά στην ανάπτυξη του μύκητα και την παράλληλη παραγωγή της εξωκυτταρικής χρωστικής, σε σύγκριση με το TSB και το YMB. Ειδικότερα, κατά την 4^{η} ημέρα της καλλιέργειας η συγκέντρωση της γλυκόζης είχε ελαττωθεί κατά 21,67 g/L, φτάνοντας τα 8,26 g/L, γεγονός που συνδέθηκε με την έναρξη της παραγωγής της χρωστικής, σημειώνοντας απορροφήσεις 0,009, 0,009 και 0,008 AU/mL, για τα 400, 470 και 500 nm, αντίστοιχα. Από την άλλη, το τέλος της

ζύμωσης συνδέθηκε τόσο με την μείωση του σακχάρου στο 1,33 g/L, όσο και με την αύξηση της παραγωγή της χρωστικής, λαμβάνοντας απορροφήσεις 0,062, 0,057 και 0,062 AU/mL, για τα 400, 470 και 500 nm, αντίστοιχα. Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε, έδειξε πως μετά το πέρας 120 ωρών ζύμωσης, είχε καταναλωθεί το 97 % της γλυκόζης, ενώ οι οπτικές πυκνότητες που μετρήθηκαν για την κίτρινη, την πορτοκαλί και την κόκκινη χρωστική, αντίστοιχα, ήταν 0,08±0,01, 0,08±0,02 και 0,02±0,01 AU/mL. Η αύξηση των απορροφήσεων των παραγόμενων χρωστικών σήμανε και την ολοκλήρωση της καλλιέργειας κατά τη 12η ημέρα, με τις απορροφήσεις να φτάνουν τα 0,66±0,07, 0,22±0,04 και 0,02±0,03 AU/mL για την κίτρινη, την πορτοκαλί και την κόκκινη χρωστική, αντίστοιχα. (Mercy et al., 2015) Αν και στην παρούσα διατριβή οι απορροφήσεις των χρωστικών ήταν χαμηλότερες από εκείνες της προαναφερθείσας έρευνας, παρατηρείται πως και στις δύο μελέτες οι κίτρινες χρωστικές παράχθηκαν αρχικά, καθώς αποτελούν τους πρώτους παραγόμενους μεταβολίτες των υγρών καλλιεργειών. Επιπλέον, συμπεραίνεται ότι η παραγωγή της πορτοκαλί και της κόκκινης χρωστικής ξεκίνησε να αυξάνεται μετά το πέρας της 4η ημέρας, γεγονός που υποδηλώνει πως η παραγωγή αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών συνδέεται με την κατανάλωση της πηγής άνθρακας και τη φάση θανάτου, στην οποία βρίσκεται ο μύκητας. (Mercy et al., 2015)

Ένας παράγοντας που διαδραμάτισε καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη των επόμενων ζυμώσεων, ήταν το pH. Στις υγρές καλλιέργειες, στις οποίες απουσίαζε το ρυθμιστικό διάλυμα, οι τιμές στο pH των υποστρωμάτων ήταν μεταβλητές και φθίνουσας πορείας, φτάνοντας κατά την τελευταία ημέρα της ζύμωσης για τις ζυμώσεις με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη, τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη στο 3,76, 4,24 και 4,03, αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες απορροφήσεις της κόκκινης χρωστικής κατά την 11η ημέρα της καλλιέργειας 0,062, 0,065 και 0,054 AU/mL. Από την άλλη, η προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος/κιτρικού νατρίου στις ζυμώσεις που ακολούθησαν, ήταν καταλυτικής σημασίας, σημειώνοντας κατά την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη τιμή pH 8,34 και οπτική πυκνότητα στα 500 nm ίση με 0,336 AU/mL. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι οι παραχθείσες χρωστικές από τον *Penicillium purpurogenum* είναι περισσότερο σταθερές σε βασικό (pH 8) ή και ουδέτερο περιβάλλον, σε σχέση με ένα όξινο υπόστρωμα ανάπτυξης, η επίδραση του οποίου ενδεχομένως να οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των δομών των κόκκινων χρωστικών, όπως για παράδειγμα η

διασύνδεση των εστερικών δεσμών ανάμεσα στη μονασκορουβραμίνη και ρουβροπουκταμίνη. (Santos-Ebinuma et al., 2013)

Επιπλέον, σημαντικός ρόλο στην εξέλιξη των υγρών καλλιεργειών έπαιξε και η πηγή του αζώτου. Ειδικότερα, αν και το προερχόμενο από το εκχύλισμα ζύμης, άζωτο συμβάλλει γενικότερα στην υψηλότερη παραγωγή χρωστικής λόγω αμινοξέων και βιταμινών που περιέχει (Mercy et al., 2015), στις ζυμώσεις με τις διάφορες αναλογίες C/N η παραγωγή ήταν μεγαλύτερη για τις αναλογίες 20:1 και 40:1, ενώ η κόκκινη χρωστική δεν παρατηρήθηκε καθόλου στην αναλογία 5:1. Συνεπώς, όσο υψηλότερες είναι οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος σε άνθρακα και άζωτο, τόσο καταστέλλεται ο μικροοργανισμός και άρα παρεμποδίζεται η παραγωγή της χρωστικής. Η τιμή της απορρόφησης στα 500 nm κατά την τελευταία ημέρα της ζύμωσης, όπου η πηγή άνθρακα ήταν η σακχαρόζη βρέθηκε στα 0,107 και 0,258 AU/mL για τις αναλογίες 20:1 και 40:1, αντίστοιχα. Αντίθετα, σύμφωνα με μελέτη που έχει γίνει, σε συνθήκες όπου ως πηγή άνθρακα ήταν διάλυμα σακχαρόζης 30 g/L και ως πηγή αζώτου διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης 5 g/L, η αντίστοιχη τιμή της οπτικής πυκνότητας βρέθηκε υψηλότερη σε σχέση με την παρούσα έρευνα και ίση με 1,052 AU/mL, (Santos-Ebinuma et al., 2013) γεγονός που επιβεβαιώνει τη σπουδαιότητα της σωστής αναλογίας άνθρακα και αζώτου. Τέλος, αποτέλεσμα της υψηλής συγκέντρωσης θρεπτικών μέσων του υποστρώματος είναι πιθανότατα και η μη επιτυχής έκβαση της υγρής καλλιέργειας με υπόστρωμα το μήλο. Η ήδη υπάρχουσα περιεκτικότητα του μήλου σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (1,02 mg/100 g ξηρού βάρους), το περιεχόμενο ποσοστό του αζώτου στις πρωτεΐνες (0,27 % ξηρό βάρος) σε συνδυασμό με το άζωτο που προστέθηκε από το διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης (2,65 g/L) αποτέλεσαν παρεμποδιστικούς παράγοντες, που κατέστειλαν τόσο την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή βιομάζας, όσο και την περαιτέρω παραγωγή της κόκκινης χρωστικής.

Τέλος, αν και οι ζυμώσεις στερεάς κατάστασης εξασφαλίζουν καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης του μικροοργανισμού, λόγω της μέγιστης εξάπλωσης των υφών, της βέλτιστης προσομοίωσης του μικροπεριβάλλοντος των μυκήτων και των χαμηλότερων απαιτήσεων σε νερό, στην παρούσα ερευνητική μελέτη εκείνο το οποίο παρατηρήθηκε, ήταν η πλήρης ανάπτυξη του μύκητα σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος, χωρίς όμως την παράλληλη παραγωγή της κόκκινης χρωστικής. Αντιθέτως, βάσει άλλων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί, η μέγιστη

απορρόφηση της κόκκινης χρωστικής στα 500 nm, μετά το πέρας 16 ημερών ζύμωσης, βρέθηκε στο 3,58 AU/g. (Καντιφεδάκη, 2017) Πιθανότατα η αιτία της μη δυνατότητας παραγωγής της επιθυμητής χρωστικής να οφειλόταν στο γεγονός ότι ο μικροοργανισμός ήταν στη φάση θανάτου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, η ολοκληρωμένη εκμετάλλευση των απόβλητων μήλων και φλοιών πορτοκαλιού αποτελεί μια πρακτική οικονομική και ταυτόχρονα φιλική προς το περιβάλλον και η οποία μπορεί να υιοθετηθεί από διάφορους επιστημονικούς κλάδους. Αντιοξειδωτικά συστατικά, πηκτίνες, αιθέρια έλαια, σάκχαρα, διαιτητικές ίνες και χρωστικές είναι μερικά από τα προϊόντα που δύναται να εξαχθούν από τα φρούτα και να ενθυλακωθούν σε τρόφιμα, καλλυντικά ή φάρμακα. Οι εξελίξεις στον τομέα της Βιοτεχνολογίας παρέχει εναλλακτικές τεχνικές για τη βιομετατροπή των αποβλήτων αυτών σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας και ιδιαίτερα για την παραγωγή βιογενών χρωστικών ουσιών. Συνεπώς, η μεγαλύτερη εμβάθυνση στη χημική σύσταση των αποβλήτων, η ολοκληρωμένη μελέτη των σταδίων επεξεργασίας τους και η βελτιστοποίηση των συνθηκών του υποστρώματος για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, τόσο σε υγρές καλλιέργειες, όσο και σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης αποτελούν προσοδοφόρα βήματα για την εξέλιξη της βιοεκμετάλλευσης των αποβλήτων, γεγονός που συνεπάγεται και καλύτερες συνθήκες ζωής για το έμμεσο ή και άμεσο μέλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aguilar-Machado, D., Morales-Oyervides, L., Contreras-Esquivel, J. C., Aguilar, C., Méndez-Zavala, A., Raso, J., & Montanez, J. (2017). Effect of ohmic heating processing conditions on color stability of fungal pigments. *Food Science and Technology International*, *23*(4), 338-348.
2. Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A., & Mafra, L. I. (2014). Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food chemistry*, *149*, 151-158.
3. Allen, R. J. L. (1940). The estimation of phosphorus. *Biochemical Journal*, *34*(6), 858.
4. Al-Saadi, N. H. M., Ahmad, N. S., & Sa, S. E. (2009). Determination of some chemical compounds and the effect of oil extract from orange peel on some pathogens. *journal of kerbala university*, *7*(2), 33-39.
5. Ángel Siles López, J., Li, Q., & Thompson, I. P. (2010). Biorefinery of waste orange peel. *Critical Reviews in Biotechnology*, *30*(1), 63-69.
6. AppliChem. Nitrogen determination by Kjeldahl method. ITW Reagents.
7. Arai, T., Kojima, R., Motegi, Y., Kato, J., Kasumi, T., & Ogihara, J. (2015). PP-O and PP-V, Monascus pigment homologues, production, and phylogenetic analysis in Penicillium purpurogenum. *Fungal biology*, *119*(12), 1226-1236.
8. Ayala, J. R., Montero, G., Campbell, H. E., García, C., Coronado, M. A., León, J. A., ... & Pérez, L. J. (2017). Extraction and Characterization of Orange Peel Essential Oil from Mexico and United States of America. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *20*(4), 897-914.
9. Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (1999). Food chemistry. ed.
10. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, *181*(4617), 1199.
11. Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., & Chemat, F. (2015). Bio-refinery of orange peels waste: a new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, *24*, 72-79.

12. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25-30.
13. Campeanu, G., Neata, G., & Darjanschi, G. (2009). Chemical composition of the fruits of several apple cultivars growth as biological crop. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *37*(2), 161-164.
14. Chen, P. S., Toribara, T. T., & Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Analytical chemistry*, *28*(11), 1756-1758.
15. Chen, W., He, Y., Zhou, Y., Shao, Y., Feng, Y., Li, M., & Chen, F. (2015). Edible filamentous fungi from the species Monascus: early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(5), 555-567.
16. Dadwal, V., Agrawal, H., Sonkhla, K., Joshi, R., & Gupta, M. (2018). Characterization of phenolics, amino acids, fatty acids and antioxidant activity in pulp and seeds of high altitude Himalayan crab apple fruits (Malus baccata). *Journal of food science and technology*, 1-10.
17. Demiray, S., Piccirillo, C., Rodrigues, C. L., Pintado, M. E., & Castro, P. M. L. (2011). Extraction of valuable compounds from Ginja cherry by-products: effect of the solvent and antioxidant properties. *Waste and Biomass Valorization*, *2*(4), 365.
18. Dhillon, G. S., Kaur, S., & Brar, S. K. (2013). Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, *27*, 789-805.
19. Gallardo Chacón, J. J. (2010). Modificacions de les Propietats Fisicoquímiques de les" Lies" de Segona Fermentació durant la Criança del Cava.
20. Garna, H., Mabon, N., Robert, C., Cornet, C., Nott, K., Legros, H., ... & Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed by alcohol. *Journal of Food Science*, *72*(1), C001-C009.
21. Hanika, C., & Carlton, W. W. (1994). Toxicology and pathology of citrinin. In *Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration* (pp. 41-63). Springer, Boston, MA.

22. Herbert, D., Phipps, P. J., & Strange, R. E. (1971). Chapter III chemical analysis of microbial cells. In *Methods in microbiology*(Vol. 5, pp. 209-344). Academic Press.
23. Hidro, P. (2013). Effect of temperature on kaffir lime oil by using Hydro-diffusion steam distillation system. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, *17*(2), 326-339.
24. Kachrimanidou, V., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Kookos, I. K., De Bruyn, M., Clark, J. H., & Koutinas, A. A. (2014). Sunflower-based biorefinery: poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from crude glycerol, sunflower meal and levulinic acid. *Bioresource technology*, *172*, 121-130.
25. Kalinowska, M., Bielawska, A., Lewandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W., & Lewandowski, W. (2014). Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry*, *84*, 169-188.
26. Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (Citrus sinensis L.) peel. *Food Chemistry*, *119*(2), 851-858.
27. Laboratories. (2018) Czapek Dox Broth, Technical Data.
28. Levey, D. J., Bissell, H. A., & O'keefe, S. F. (2000). Conversion of nitrogen to protein and amino acids in wild fruits. *Journal of Chemical Ecology*, *26*(7), 1749-1763.
29. Liakou, V., Pateraki, C., Palaiogeorgou, A. M., Kopsahelis, N., de Castro, A. M., Freire, D. M. G., ... & Koutinas, A. (2018). Valorisation of fruit and vegetable waste from open markets for the production of 2, 3-butanediol. *Food and Bioproducts Processing*, *108*, 27-36.
30. Liang, N., & Kitts, D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, *19*(11), 19180-19208.
31. Lie, S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, *79*(1), 37-41.
32. M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M., & Boudhrioua, N. M. (2015). Proximate chemical composition of orange peel and variation of phenols and antioxidant activity during convective air drying. *Journal of New Sciences*.

33. Malik, K., Tokkas, J., & Goyal, S. (2012). Microbial pigments: a review. *Int J Microbial Res Technol*, *1*(4), 361-365.
34. Mapari, S. A., Thrane, U., & Meyer, A. S. (2010). Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants. *Trends in biotechnology*, *28*(6), 300-307.
35. Matharu, A. S., de Melo, E. M., & Houghton, J. A. (2016). Opportunity for high value-added chemicals from food supply chain wastes. *Bioresource technology*, *215*, 123-130.
36. Mercy, N. P. J., Nithyalakshmi, B., & Aadhithiya, L. R. (2015). Extraction of orange oil by improved steam distillation and its characterization Studies. *International Journal of Engineering Technology, Management and Applied Sciences*, *3*(2), 1-8.
37. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, *31*(3), 426-428.
38. Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, *65*, 28-41.
39. Morales-Oyervides, L., Oliveira, J. C., Sousa-Gallagher, M. J., Méndez-Zavala, A., & Montañez, J. C. (2015). Effect of heat exposure on the colour intensity of red pigments produced by Penicillium purpurogenum GH2. *Journal of Food Engineering*, *164*, 21-29.
40. Nabi, A. Q. (2017). SYBR Green Real Time PCR Method for Direct Quantification and Detection of Escherichia coli from Clinical Samples. *ZANCO Journal of Pure and Applied Sciences*, *29*(2).
41. Nielsen, S. S. (Ed.). (2003). *Food analysis laboratory manual* (p. 557). Nueva York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
42. Onivogui, G., Zhang, H., Mlyuka, E., Diaby, M., & Song, Y. (2014). Chemical composition, nutritional properties and antioxidant activity of monkey apple (Anisophyllea laurina R. Br. ex Sabine). *J Food Nutr Res*, *2*(6), 281-7.
43. Pateraki, C., Patsalou, M., Vlysidis, A., Kopsahelis, N., Webb, C., Koutinas, A. A., & Koutinas, M. (2016). Actinobacillus succinogenes: advances on succinic acid production and prospects for development of integrated biorefineries. *Biochemical engineering journal*, *112*, 285-303.

44. Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Nunez, M. J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (Prunus amygdalus) and pine sawdust (Pinus pinaster). *Food Chemistry*, *85*(2), 267-273.
45. Ramos, A. M., & Ibarz, A. (1998). Density of juice and fruit puree as a function of soluble solids content and temperature. *Journal of Food Engineering*, *35*(1), 57-63.
46. Santos-Ebinuma, V. C., Roberto, I. C., Simas Teixeira, M. F., & Pessoa Jr, A. (2013). Improving of red colorants production by a new Penicillium purpurogenum strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability. *Biotechnology progress*, *29*(3), 778-785.
47. Santos-Ebinuma, V. C., Teixeira, M. F. S., & Pessoa, A. (2013). Submerged culture conditions for the production of alternative natural colorants by a new isolated Penicillium purpurogenum DPUA 1275. *J Microbiol Biotechnol*, *23*, 802-810.
48. Sawalha, S. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE–MS/MS. *Food Chemistry*, *116*(2), 567-574.
49. Sigma-Aldrich https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/c3878?lang=en&region=GR (visited on 20/08/2018)
50. Sigma-Aldrich https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/251275?lang=en&region=GR (visited on 20/08/2018)
51. Sigma-Aldrich https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/183164?lang=en&region=GR (visited on 20/08/2018)
52. Sigma-Aldrich https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h5254?lang=en&region=GR (visited on 20/08/2018)
53. Sigma-Aldrich https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1017?lang=en&region=GR (visited on 20/08/2018)

54. Sigma-Aldrich https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/citrinin2502551875211?lang=en&region=GR (visited on 20/08/2018)
55. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, *1617*, 1-16.
56. Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Determination of extractives in biomass. *Laboratory analytical procedure (LAP)*.
57. Thompson, A. (2018) Extracting limonene from oranges by steam distillation. Royal Society of Chemistry.
58. Tsakona, S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Kookos, I. K., & Koutinas, A. A. (2014). Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by Lipomyces starkeyi. *Journal of biotechnology*, *189*, 36-45.
59. Voragen, A. G., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, *20*(2), 263.
60. Wai, W. W., Alkarkhi, A. F., & Easa, A. M. (2010). Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of durian rind pectin: An experimental design. *Food and Bioproducts Processing*, *88*(2-3), 209-214.
61. Wheatley, A. (Ed.). (1990). *Anaerobic digestion: a waste treatment technology* (Vol. 31). Chapman & Hall.
62. Wicker, L., Hart, H. E., & Parish, M. E. (1989). Recovery and utilization of byproducts from citrus processing wastes. In *ACS Symposium series American Chemical Society*.
63. Wilkins, M. R., Suryawati, L., Maness, N. O., & Chrz, D. (2007). Ethanol production by Saccharomyces cerevisiae and Kluyveromyces marxianus in the presence of orange-peel oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*(8), 1161-1168.
64. Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., & Hu, X. (2007). Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry*, *103*(1), 88-93.

65. Βουδούρης, Ε. Κ., & Κοντομηνάς, Μ. Γ. (2004). Ανάλυση τροφίμων: θεωρία και εφαρμογές. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
66. Γαρούφης Α., & Μαλανδρίνος Γ. Ανόργανη Χημεία Ι: Διαλύτες, οξέα-βάσεις, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
67. Γιαννιώτης Σ. (2011). Μηχανική Τροφίμων: Φυσικές Διεργασίες Μηχανικής Τροφίμων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
68. Καντιφεδάκη, Α. (2017). Βιοτεχνολογική αξιοποίηση αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων προς παραγωγή χρωστικών ουσιών με στελέχη μυκήτων.
69. Χατζηϊωάννου Θ.Π. (2003) Χημική Ισορροπία και Ανόργανη Ποιοτική Ημιμικροανάλυση.
70. Χατζηϊωάννου Θ.Π., & Κούππαρη Μ.Α. (2010) Ενόργανη Ανάλυση