

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Π.Μ.Σ. «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση: «Μηχανική Τροφίμων και Εφαρμογή Η/Υ στην Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων»

Αξιοποίηση αμυλούχων βιομηχανικών
αποβλήτων για την παραγωγή μικροβιακού
λίπους από τον μύκητα *Mortierella isabellina*



Mortierella isabellina, microscopy
K. Nishimura

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια:

ΚΡΗΤΙΚΟΥ ΜΑΡΙΑΝΝΑ

Εξεταστική Επιτροπή:

Κουτίνας Αποστόλης, Λέκτορας (Επιβλέπων)

Γιαννιώτης Σταυριανός, Αν. Καθηγητής

Παπανικολάου Σεραφείμ, Επ. Καθηγητής

Αθήνα, 2010

Αφιερωμένο,

*Στον παππού μου Λουκά
και την γιαγιά μου Άννα
που τους «έχασα» κατά
την διάρκεια διεξαγωγής
της παρούσας μελέτης*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στα εργαστήρια «Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων» και «Μηχανικής Τροφίμων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου». Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κυρίους Κουτίνα Αποστόλη (επιβλέπων της παρούσας μελέτης), Γιαννιώτη Σταυριανό και Παπανικολάου Σεραφείμ για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπό μου και την ανάθεση αυτού του τόσο ενδιαφέροντος θέματος ως θέμα της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στις υποψήφιες διδάκτορες Χατζηφράγκου Αφροδίτη, Μετσοβίτη Μαρία και Μπέλκα Κατερίνα για την άψογη συνεργασία μας και την πολύτιμη πρακτική, αλλά και ηθική υποστήριξή τους. Ευχαριστώ ακόμη την κυρία Καλαντζή Ουρανία για την ουσιαστική βοήθειά της στο ξεκίνημα της παρούσας μελέτης. Τέλος, επιθυμώ να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου, για την κατανόηση και την συμπαράστασή τους καθ'όλη την διάρκεια διεξαγωγής αυτής της μελέτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της δυνατότητας παραγωγής μικροβιακού λίπους από απόβλητα βιομηχανιών τροφίμων, το οποίο δυνητικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για την παραγωγή πρόσθετων στα τρόφιμα υψηλής διατροφικής και φαρμακευτικής αξίας, είτε για την παραγωγή βιοντήζελ. Η παραγωγή μικροβιακού λίπους στηρίχτηκε στην αξιοποίηση των στερεών αμυλοπρωτεϊνούχων (κυρίως αμυλούχων) αποβλήτων από βιομηχανία παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής. Τα αμυλοπρωτεϊνούχα απόβλητα μετατράπηκαν σε ένα θρεπτικό μέσο για την παραγωγή μικροβιακού λίπους μέσω ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιώντας ακατέργαστα ένζυμα (αμυλολυτικά και πρωτεολυτικά) που παρήχθησαν κατά τη διάρκεια ζύμωσης στερεής κατάστασης από τον βασιδιομύκητα *Aspergillus awamori*. Η ζύμωση στερεής κατάστασης πραγματοποιήθηκε με χρήση παραπροϊόντων άλεσης σίτου ως υπόστρωμα. Μετά το πέρας της ζύμωσης στερεής κατάστασης, τα εναπομείναντα στερεά προστέθηκαν σε υδατικό εναιώρημα των αμυλούχων αποβλήτων. Το υδρόλυμα που παρήχθη χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την πραγματοποίηση υγρής ζύμωσης του ελαιογόνου ζυγομύκητα *Mortierella isabellina*. Κατά τη διάρκεια της υγρής ζύμωσης αναλύθηκαν ποσοτικά οι κινητικές των συγκεντρώσεων: α) αναγόντων σακχάρων (με την μέθοδο DNS), β) γλυκόζης (ενζυμικά), γ) αζώτου που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες (με τη μέθοδο της νινυδρίνης), δ) μικροβιακής μάζας και ε) μικροβιακού λίπους. Επιλεγμένα δείγματα λίπους υπόκειντο σε μεθυλεστεροποίηση, ώστε να μετατραπούν σε πτητικά (FAME) κι έτσι να καταστεί δυνατός ο ποιοτικός προσδιορισμός τους με GC-FID. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης (70,87g/L) και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (281,44mg/L) στο υδρόλυμα (κατόπιν 24ωρης υδρόλυσης του αποβλήτου συγκέντρωσης 100g/L) επιτεύχθηκε όταν τα αμυλολυτικά και πρωτεολυτικά ένζυμα που διενεργούσαν την υδρόλυση προέρχονταν από ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* διάρκειας τριών ημερών. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι στην περίπτωση που η υδρόλυση του αποβλήτου συγκέντρωσης 100g/L είχε διαρκέσει 24h, η υψηλότερη συγκέντρωση μικροβιακής μάζας, που παρατηρήθηκε όταν το υδρόλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ζύμωσης υγρής κατάστασης του μύκητα *Mortierella isabellina*, ήταν 19,60g/L, με αντίστοιχη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού λίπους 13,07g/L, δίνοντας την υψηλότερη απόδοση βιομάζας σε λίπος που επιτεύχθηκε στα πλαίσια αυτής της μελέτης (66,7%). Η αύξηση της διάρκειας υδρόλυσης του αποβλήτου συγκέντρωσης 100g/L, από 24h σε 48h είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή 31,38g/L βιομάζας και 12,67g/L ενδοκυτταρικού λίπους, ενώ στην περίπτωση που, εκτός από τη διάρκεια της υδρόλυσης, αυξήθηκε και η συγκέντρωση του υδρολυθέντος αποβλήτου σε 150g/L, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους που επιτεύχθηκε ήταν 45,73g/L και 19,37g/L αντιστοίχως.

ABSTRACT

Aim of the present study was to evaluate the possibility of microbial oil production from food industry wastes, which could be used either to produce additives for high nutritional and medical value foods or to produce biodiesel. Single cell oil (SCO) production was based on the exploitation of starch-based waste streams from the confectionery industry. The starch-based waste was converted into a nutrient-complete medium for microbial oil production by enzymatic hydrolysis using crude enzymes (amylolytic and proteolytic) that were produced during solid-state fermentation of the fungal strain *Aspergillus awamori*. Solid-state fermentation took place using wheat flour milling by-products as substrate. After the end of the solid-state fermentation, the remaining solids were added to a suspension of the starch-based waste to promote the enzymatic hydrolysis of starch and protein. The maximum glucose (70.87g/L) and free amino nitrogen concentrations (281.44 mg/L) were achieved after 24 h hydrolysis of 100g/L of the waste when solids from 72 h solid-state fermentation were used. The hydrolysate produced was used as fermentation medium in submerged cultures for the production of microbial oil by the oleaginous zygomycetes *Mortierella isabellina*. In the case that a hydrolysate produced after 24 h hydrolysis with an initial concentration of 100 g/L waste was used as substrate for the submerged fermentation of the fungus *Mortierella isabellina*, the final cell dry weight was 19.6g/L with a corresponding concentration of single cell oil of 13.07g/L, which is the highest intracellular oil content obtained in the present study (66.7% w/w). An extension of the hydrolysis of starch-based waste to 48h (the initial solid concentration was 100 g/L) resulted in the production of 31.38g/L of total dry weight and 12.67g/L of single cell oil. In the case that the hydrolysate was produced from 150 g/L initial waste concentration and 48h hydrolysis duration, the maximum total dry weight and microbial oil production achieved were 45.73g/L and 19.37g/L respectively.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Σκοπός της παρούσας μελέτης	8
1.2 Απαραίτητα λιπαρά οξέα	10
1.2.1 γ-λινολενικό οξύ (GLA)	13
1.3 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και μικροβιακό λίπος	14
1.4 Βιοχημεία συσσώρευσης μικροβιακού λίπους	17
1.5 Συμβολή των μικροοργανισμών στην Τεχνολογία Αειφόρου Ανάπτυξης	21
1.5.1 Ανανεώσιμα υποστρώματα κατάλληλα για τη συσσώρευση μικροβιακού λίπους	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1 Ζύμωση στερεής κατάστασης	23
2.1.1 Βιολογικό υλικό	23
2.1.2 Θρεπτικό υπόστρωμα και συνθήκες καλλιέργειας του μύκητα	24
2.1.3 Υδρόλυση στερεών αποβλήτων βιομηχανίας προϊόντων ζαχαροπλαστικής	25
2.1.4 Χημικές αναλύσεις	27
2.1.4.1 Προσδιορισμός γλυκόζης	27
2.1.4.2 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων	28
2.1.4.3 Προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων	30
2.2 Ζύμωση υγρής κατάστασης	31
2.2.1 Βιολογικό υλικό	31
2.2.2 Θρεπτικό υπόστρωμα και συνθήκες καλλιέργειας του μύκητα	31
2.2.3 Χημικές Αναλύσεις	33
2.2.3.1 Προσδιορισμός διαλυμένου O ₂ και pH	33
2.2.3.2 Συλλογή βιομάζας	34
2.2.3.3 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων	34
2.2.3.4 Προσδιορισμός γλυκόζης	35
2.2.3.5 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων	35
2.2.3.6 Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
3.1 Ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα <i>Aspergillus awamori</i> & υδρόλυση στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου	39

3.1.1 Υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου με ένζυμα από ζύμωση στερεάς κατάστασης του <i>Aspergillus awamori</i> κατόπιν απομάκρυνσης των στερεών της ζύμωσης	43
3.1.1.1 Υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου με ένζυμα από ζύμωση στερεάς κατάστασης του <i>Aspergillus awamori</i> διάρκειας μίας ημέρας κατόπιν απομάκρυνσης των στερεών της ζύμωσης	44
3.1.1.2 Υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου με ένζυμα από ζύμωση στερεάς κατάστασης του <i>Aspergillus awamori</i> διάρκειας δύο ημερών κατόπιν απομάκρυνσης των στερεών της ζύμωσης	47
3.1.1.3 Υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου με ένζυμα από ζύμωση στερεάς κατάστασης του <i>Aspergillus awamori</i> διάρκειας τριών ημερών κατόπιν απομάκρυνσης των στερεών της ζύμωσης	49
3.1.1.4 Υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου με ένζυμα από ζύμωση στερεάς κατάστασης του <i>Aspergillus awamori</i> διάρκειας τεσσάρων ημερών κατόπιν απομάκρυνσης των στερεών της ζύμωσης	52
3.1.2 Υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου με ένζυμα από ζύμωση στερεάς κατάστασης του <i>Aspergillus awamori</i> χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης	54
3.1.2.1 Υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου με ένζυμα από ζύμωση στερεάς κατάστασης του <i>Aspergillus awamori</i> διάρκειας μίας ημέρας χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης	56
3.1.2.2 Υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου με ένζυμα από ζύμωση στερεάς κατάστασης του <i>Aspergillus awamori</i> διάρκειας δύο ημερών χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης	59
3.1.2.3 Υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου με ένζυμα από ζύμωση στερεάς κατάστασης του <i>Aspergillus awamori</i> διάρκειας τριών ημερών χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης	61
3.1.2.4 Υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου με ένζυμα από ζύμωση στερεάς κατάστασης του <i>Aspergillus awamori</i> διάρκειας τεσσάρων ημερών χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης	64
3.2 Ζύμωση υγρής κατάστασης του μύκητα <i>Mortierella isabellina</i> σε υδρόλυμα αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου	67
3.2.1 Πρώτο πείραμα καλλιέργειας του μύκητα <i>Mortierella isabellina</i> σε υδρόλυμα αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου	70
3.2.2 Δεύτερο πείραμα καλλιέργειας του μύκητα <i>Mortierella isabellina</i> σε υδρόλυμα αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου	74
3.2.3 Τρίτο πείραμα καλλιέργειας του μύκητα <i>Mortierella isabellina</i> σε υδρόλυμα αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου	79
3.2.4 Τέταρτο πείραμα καλλιέργειας του μύκητα <i>Mortierella isabellina</i> σε υδρόλυμα αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου	83
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	88
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	98
ΒΙΒΛΙΟΦΡΑΦΙΑ	101

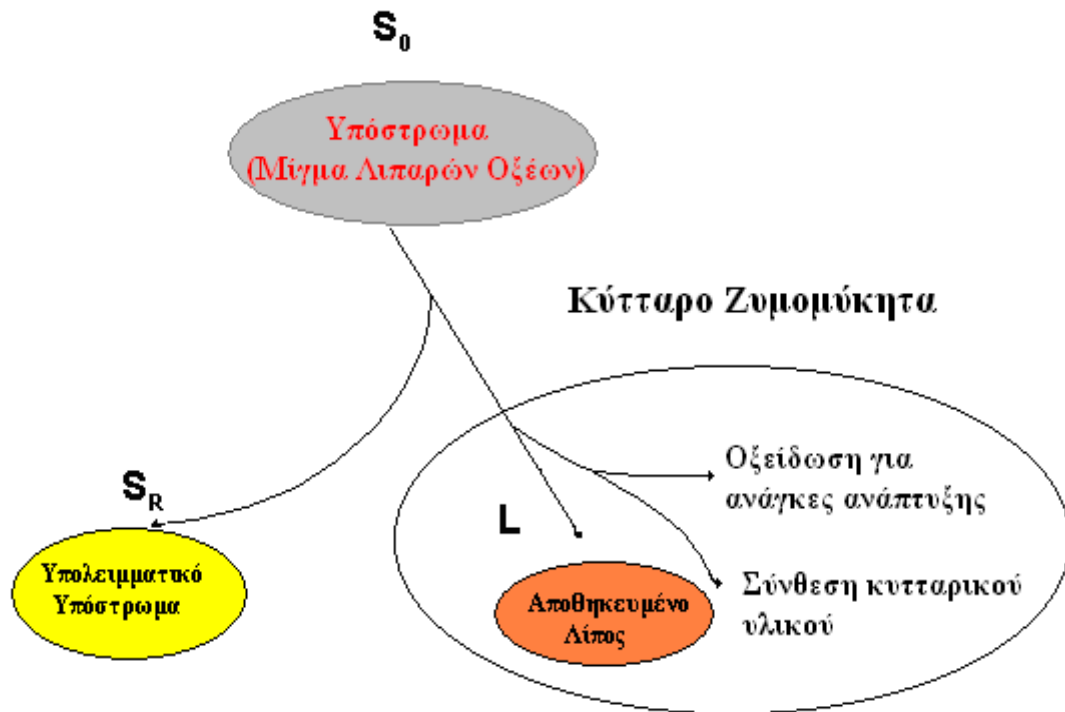
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, ερευνήθηκε η δυνατότητα παραγωγής μικροβιακού λίπους με χρήση αποκλειστικά ανανεώσιμων πρώτων υλών, ήτοι αποβλήτων και παραπροϊόντων βιομηχανιών τροφίμων, αντικαθιστώντας εμπορικά παρασκευάσματα θρεπτικών συστατικών.

Τα παραγόμενα από τους μικροοργανισμούς λιπίδια και κυρίως από τους ζυγομύκητες, στους οποίους ανήκει και ο *Mortierella isabellina* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, δύναται να χρησιμοποιηθούν για την βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου και ειδικότερα βρίσκουν χρήση στην παραγωγή προσθέτων σε τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας και στην παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής και φαρμακευτικών σκευασμάτων. Επίσης το μικροβιακό λίπος δύναται να βρει χρήση και στην παραγωγή καυσίμου βιολογικής προέλευσης (βιοντήζελ), εφαρμογή με μεγάλη οικολογική και οικονομική σημασία.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να αποδείξει ότι οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να συντελέσουν στην ανάπτυξη και εφαρμογή της αειφόρου τεχνολογίας. Η χρήση των αγροτικών και βιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων ως θρεπτικά υποστρώματα για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αλματώδους αύξησης όλων των τομέων παραγωγής και διότι τα διάφορα αυτά απόβλητα και παραπροϊόντα παράγονται σε πολύ μεγάλες ποσότητες, με αποτέλεσμα η διαχείρισή τους να αποτελεί δυσεπίλυτο πρόβλημα για τη βιομηχανία (Peters, 2007). Κάτι τέτοιο αφενός θα συνέβαλε στη μείωση της ρυπαντικής ισχύος των αποβλήτων και αφετέρου θα συντελούσε στην παραγωγή μικροβιακού λίπους, από το οποίο θα μπορούσε να παραληφθεί το υψίστης σημασίας γ-λινολενικό οξύ, ενώ το υπόλοιπο λίπος θα μπορούσε να οδεύσει προς παραγωγή εναλλακτικού καυσίμου βιολογικής προελεύσεως (βιοντήζελ–biodiesel) (Αγγελής, 2007, Papanikolaou et al., 2007). Επιπροσθέτως, ο *M.isabellina* ATHUM 2935 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λιπιδίων υψηλής προστιθέμενης αξίας (PUFAs ή λίπος εξεζητημένης δομής τριγλυκεριδίων, όπως το λίπος του κακάο), μέσω βιοτροποποίησης των λιπιδίων του μύκητα (Papanikolaou et al., 2003) (εικ.1.1).



Εικόνα 1.1 Βιοτροποίηση λίπους κατά την αύξηση ζύμης σε λιπαρά υλικά (Paranikolaou and Aggelis, 2003)

Συνεπώς, από όλα τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η μελέτη των μικροοργανισμών δύναται να παίζει σπουδαίο ρόλο στην βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου, επιδρώντας θετικά σημαντικούς τομείς όπως η Οικολογία, η Οικονομία και η Φαρμακευτική.

1.2 ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Τα λιπαρά οξέα είναι αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα. Στα βιολογικά συστήματα τα λιπαρά οξέα απαντώνται κατά κανόνα ως εστέρες και σπάνια είναι ελεύθερα. Η αλειφατική αλυσίδα τους αποτελείται από άρτιο ή περιττό αριθμό ατόμων άνθρακα και το μήκος της ποικίλει από 4 μέχρι 60 άτομα άνθρακα. Τα πιο συχνά απαντώμενα λιπαρά οξέα στους ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς έχουν 12-20 άτομα άνθρακα. Η αλειφατική αλυσίδα είναι δυνατόν να είναι κορεσμένη ή ακόρεστη, δηλαδή να περιέχει έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς (Κατινάκης, 2004).

Σε μια μακριά ανθρακική αλυσίδα ενός λιπαρού οξέως, ο άνθρακας του τελικού μεθυλίου καλείται ωμέγα. Ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που μεσολαβούν από το ωμέγα άκρο του λιπαρού οξέως έως το διπλό δεσμό, διακρίνουμε 3 ομάδες λιπαρών οξέων τα ω-3, ω-6 και ω-9 λιπαρά οξέα. Εναλλακτικά, το καρβοξυλικό άκρο του μορίου καλείται δέλτα (Δ) και ο διπλός δεσμός στο μόριο προσδιορίζεται σε σχέση με την απόσταση που έχει από αυτόν.

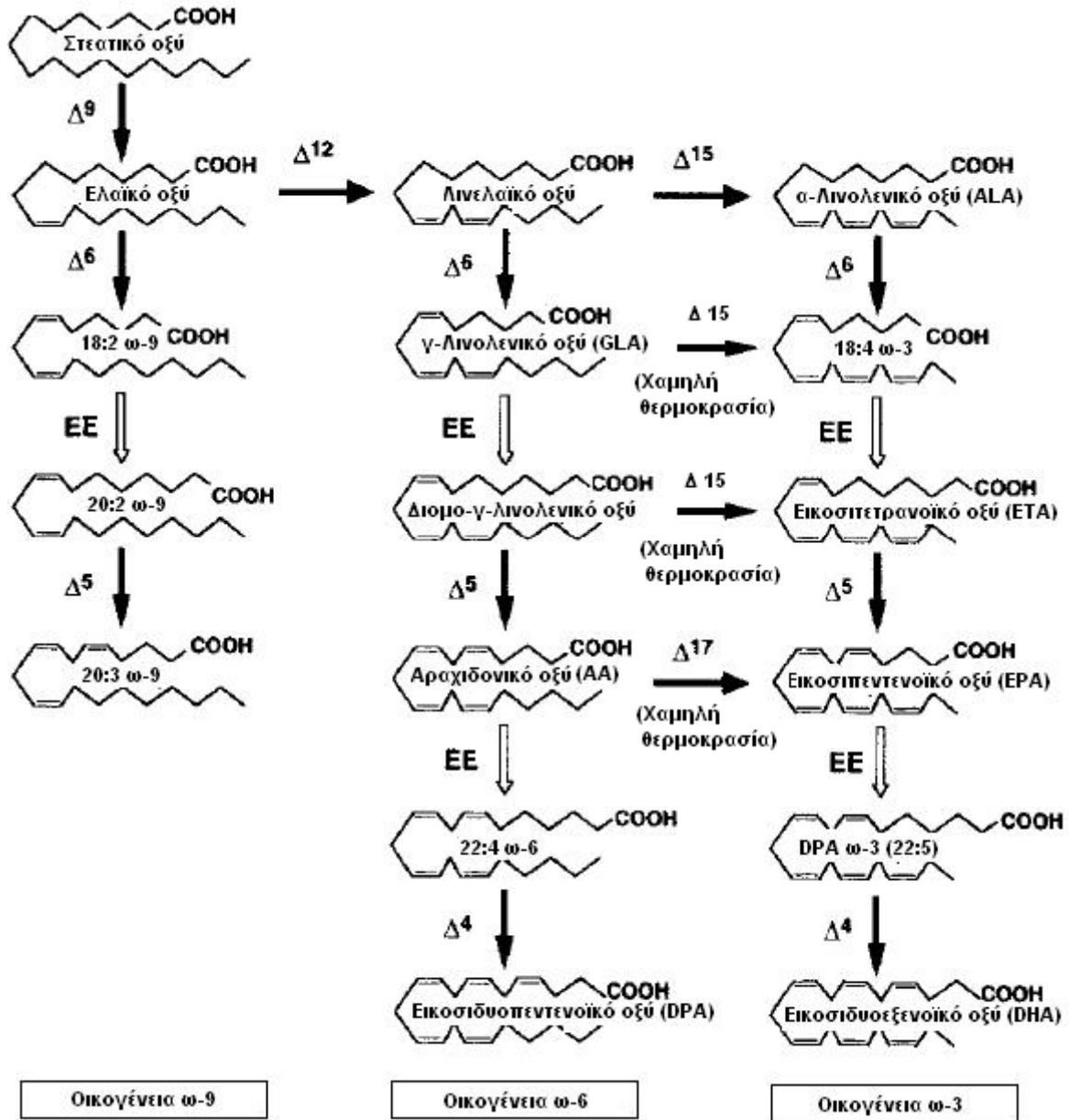
Ο ανθρώπινος οργανισμός έχει την ικανότητα να παράγει τα περισσότερα από τα λιπαρά που χρειάζεται όπως τη χοληστερόλη, κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα, υπάρχουν όμως δύο λιπαρά οξέα για τα οποία ο οργανισμός δεν μπορεί να προβεί στη *de novo* βιοσύνθεσή τους, αλλά μπορεί χρησιμοποιώντας αυτά σαν υπόστρωμα να βιοσυνθέσει πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μεγαλύτερων ανθρακικών αλυσίδων. Αυτά είναι το λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω-6) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3, ω-3). Το λινελαϊκό οξύ αποτελείται από 18 άτομα άνθρακα με δύο διπλούς δεσμούς και είναι ένα ωμέγα 6 λιπαρό οξύ, ενώ το άλφα-λινολενικό οξύ αποτελείται επίσης από 18 άτομα άνθρακα αλλά με τρεις διπλούς δεσμούς και είναι ένα ωμέγα 3 λιπαρό οξύ. Η θέση του διπλού δεσμού σε ένα μόριο παίζει καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του μέσα στον οργανισμό και είναι ακόμα πιο σημαντική για τους διπλούς δεσμούς κοντά στο μεθυλικό άκρο, δεδομένου ότι το ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να προσθέσει διπλούς δεσμούς κοντά σε αυτό. Στον ανθρώπινο οργανισμό δεν υπάρχει η δυνατότητα να βιοσυντεθούν ωμέγα 3 και ωμέγα 6 λιπαρά οξέα λόγω της μη ύπαρξης ενζύμων με τη δυνατότητα πρόσθεσης διπλού δεσμού μακρύτερα από τον 9^ο άνθρακα, μετρώντας από το καρβοξυλικό άκρο. Για τον ίδιο λόγο δεν είναι δυνατές μετατροπές των ωμέγα 3 σε ωμέγα 6 και το αντίθετο. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο τα ωμέγα 3 και 6 λιπαρά χαρακτηρίζονται ως απαραίτητα (Essential fatty acids - EFAs), δηλαδή ο οργανισμός δεν μπορεί να προβεί στη *de novo* σύνθεσή τους και είναι υποχρεωμένος να τα αποκτήσει από

την τροφή. Όμως είναι δυνατόν να βιοσυντεθούν ωμέγα 9 λιπαρά οξέα όπως είναι επίσης δυνατόν να προστεθούν και άλλοι διπλοί δεσμοί κοντά όμως στο καρβοξυλικό άκρο.

Μετά την εντερική απορρόφησή τους τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids – PUFAs) μεταφέρονται στο ήπαρ, όπου σε περίπτωση ένδειας της τροφής σε αραχιδονικό οξύ (AA), το απαιτούμενο AA για τον οργανισμό προέρχεται από το λινελαϊκό οξύ (LA). Η βιομετατροπή τόσο του LA σε AA, όσο και των υπολοίπων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μεταξύ, τους πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας σειράς ενζύμων που εδράζονται στα μικροσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου ή στα μιτοχόνδρια. Έτσι το LA μετατρέπεται σε GLA (γ-λινολενικό οξύ) και το τελευταίο σε DGLA (διομο-γ-λινολενικό οξύ) και ακολούθως σε AA, ενώ το α-λινολενικό οξύ (ALA) μετατρέπεται σε εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA) και αυτό σε εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA). (Το GLA και το ALA είναι ισομερή μόρια, με το πρώτο όμως να είναι ωμέγα 6 και το δεύτερο ωμέγα 3. Οι δε ονομασίες τους είναι κοινές και τα συνθετικά άλφα και γάμα δεν έχουν καμία χημική σημασία). Μετά τους ανωτέρω βιοσχηματισμούς στο ήπαρ, τα PUFAs μεταφέρονται στους ιστούς, όπου χρησιμεύουν ως δομικό συστατικό των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών, διεργασία η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της δομής, της ρευστότητας και της λειτουργικότητας των μεμβρανών και όπου το AA αποτελεί υπόστρωμα για τη σύνθεση ενός μεγάλου εύρους βραχύβιων ρυθμιστικών μορίων του οργανισμού, όπως προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες, θρομβοξάνες και υδροξύ-λιπαρά οξέα, ουσίες γνωστές και ως εικοσανοειδή, υπεύθυνες για την ρύθμιση σημαντικών βιολογικών λειτουργιών (Horrobin, 1992, Certik and Shimizu, 1999, Ratledge, 2004). Για κάθε πολυακόρεστο λιπαρό οξύ η συγκέντρωση του στα φωσφολιπίδια εξαρτάται από την αναλογία του στο σύνολο των λιπαρών οξέων της διατροφής. Το είδος του πολυακόρεστου λιπαρού οξέως που βρίσκεται ενσωματωμένο στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης εξαρτάται από το λόγο LA:ALA της διατροφής. Έτσι όταν το LA και το ALA συνυπάρχουν στη δίαιτα με λόγο 6:1, ευνοείται η βιοσύνθεση του AA από το LA συγκριτικά με το σχηματισμό του DHA από το ALA. Το ένζυμο Δ^6 δεσατουράση είναι κοινό για το πρώτο στάδιο των βιομετασχηματισμών των ωμέγα 3 και 6 λιπαρών οξέων, οπότε το LA και το ALA ανταγωνίζονται για την λειτουργία του. Η δράση του ενζύμου αναστέλλεται από το διαβήτη και το αλκοόλ.

Η βάση της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων είναι το στεατικό οξύ (C18:0), οι δε βιοχημικές αντιδράσεις σύνθεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων λαμβάνουν χώρα κατά το ακόλουθο σχήμα (εικ. 1.2):

ΕΕ: Ελονγκάση
 Δ: Δεσατουράση (ή αφυδρογονάση)



Εικόνα 1.2 Βιοσυνθετική οδός *de novo* γένεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) (Certik and Shimizu, 1999)

1.2.1 γ-ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟ ΟΞΥ (GLA)

Η σύνθεση του γ-λινολενικού οξέος, προάγγελου μορίου των προσταγλανδινών, πραγματοποιείται μετά από την Δ6 αφυδρογόνωση του λινελαϊκού οξέος (C18:2, ω-6). Το εν λόγω λιπαρό οξύ συναντάται σπανίως σε σημαντικές ποσότητες σε φυτικούς ιστούς, ενώ κυριότερες πηγές του αποτελούν οι σπόροι του ηράνθεμου (*Oenothera biennis*), στο έλαιο των οποίων το GLA ευρίσκεται σε ποσοστό 8-10% (w/w), οι σπόροι του βοτάνου *Borago officinalis* σε ποσοστό 24-25% (w/w) και οι σπόροι του φυτού *Ribes nigrum* σε ποσοστό 16-17% (w/w) (Ratlidge, 1994, Chen and Liu, 1997, Certik and Shimizu, 1999).

Εκτός από διατροφικό παράγοντα, το γ-λινολενικό οξύ αποτελεί και έναν θεραπευτικό παράγοντα, καθώς υφίσταται ως ουσία εντός φαρμακευτικών σκευασμάτων για την αντιμετώπιση ορισμένων μορφών καρκίνου, του διαβήτη, περιπτώσεων εκζέματος, προεμμηνορροϊκής έντασης, φλεγμονών και άλλων παθολογικών καταστάσεων (Horrobin, 1992).

Η αντικαρκινική δράση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως το γ-λινολενικό (GLA), το αραχιδονικό (AA) ή το εικοσιδύο-εξαενοϊκό οξύ (DHA), έγκειται στην ικανότητά τους να επιφέρουν κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων, μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης. Ο ακριβής μηχανισμός απόπτωσης των PUFA δεν είναι ακόμη πλήρως αποσαφηνισμένος. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες κάνουν λόγο για πιθανή ικανότητα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων να δρουν σε γονιδιακό και ογκογονιδιακό επίπεδο, είτε εμποδίζοντας την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την σύνθεση πρωτεϊνών που έχουν αντιοξειδωτική δράση εντός των καρκινικών κυττάρων, είτε μέσω της φωσφορυλίωσης αντιοξειδωτικών παραγόντων των καρκινικών κυττάρων (π.χ. η πρωτεΐνη BCL-2), προκαλώντας έτσι απόπτωση σε διάφορα είδη καρκινικών κυττάρων (Das, 1999, Roynette et al., 2004). Η έκθεση σειρών καρκινικών κυττάρων του επιθηλίου του εντέρου σε PUFAs προκαλεί παρεμπόδιση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε διαφορετικό βαθμό και με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο, αυξάνει την ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης και την οξειδωση των λιπαρών οξέων, με αποτέλεσμα σε πρώτο στάδιο την παρεμπόδιση της σύνθεσης κυτταρικού DNA και κατά δεύτερο την κατάτμησή του, στοιχεία χαρακτηριστικά της απόπτωσης των κυττάρων (Mengeaud et al., 1992, Hrelia et al., 1999, Nano et al., 2003). Σημειώνεται δε, ότι όταν τα κύτταρα υποστούν προεπάση ή συνεπάση με αντιοξειδωτικούς παράγοντες όπως η βιταμίνη E, παρατηρείται μερική ή και ολική αναστροφή της κυτταροτοξικής επίδρασης των PUFAs στα καρκινικά κύτταρα. Το γεγονός

αυτό οφείλεται στην παρεμπόδιση που ασκεί η βιταμίνη Ε στην οξείδωση των λιπαρών οξέων, αποτρέποντας την φωσφορυλίωση της BCL-2 και τελικά την απόπτωση των κυττάρων (Mengeaud et al., 1992, Das 1999, Nano et al., 2003).

Αξίζει δε να σημειωθεί πως το γ-λινολενικό οξύ, ενώ έχει σαφή κυτταροτοξική επίδραση σε σειρές καρκινικών κυττάρων, προκαλεί μικρή ή και καμία βλάβη σε σειρές υγιών κυττάρων. Το γεγονός αυτό φαίνεται να έχει αντίκτυπο σε κλινικό επίπεδο, καθώς κατά την χημειοθεραπεία κακοηθών όγκων, είναι επιθυμητή η επίδραση των φαρμάκων εκλεκτικά μόνο στον όγκο και όχι σε παρακείμενα υγιή κύτταρα. Επίσης, η δράση του γ-λινολενικού οξέος μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στην αντιμετώπιση φαινομένων αντίστασης των καρκινικών κυττάρων σε συνήθη αντικαρκινικά φάρμακα (Hrelia et al., 1999, Menéndez et al., 2001)

1.3 ΕΛΑΙΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΛΙΠΟΣ

Ως ελαιογόνοι νοούνται οι μικροοργανισμοί εκείνοι, οι οποίοι αναπτυσσόμενοι σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος, δύναται να συσσωρεύσουν λίπος εντός των κυττάρων τους, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% κατά βάρος επί ξηράς ουσίας. Μάλιστα, ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος έως και 70% w/w επί της ξηράς τους ουσίας (Ratledge, 2002). Η χρησιμοποίηση των δυνάμενων να παράξουν ενδοκυτταρικό λίπος μικροοργανισμών (oleaginous ή oil-bearing microorganisms) έχει ήδη αναφερθεί από τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, επισταμένη όμως μελέτη των μικροοργανισμών αυτών πραγματοποιείται τα τελευταία 35 χρόνια (Aggelis et al., 1988, 1990, Ratledge, 1994, 2002, Certik and Shimizu, 1999, Αγγελής, 2007). Το ενδιαφέρον για την παραγωγή των λιπιδίων αυτών, καλουμένων και μικροβιακών ή μονοκυτταρικών λιπιδίων (microbial oils ή single cell oils) είναι μεγάλη καθώς αποτελούν πηγή σημαντικών λιπαρών οξέων που δεν απαντώνται συχνά στη φύση. Το εν λόγω λίπος μπορεί να περιέχει υψηλές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) σπουδαίας διατροφικής και φαρμακευτικής σημασίας. Αυτά τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται στην κλινική διατροφή και ως πρώτες ύλες για την παρασκευή ειδικών τροφών και καλλυντικών (Ratledge, 1994, Αγγελής, 2007). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εστιάζεται στο γ-λινολενικό οξύ (GLA, ^{Δ6,9,12}C18:3), ένα λιπαρό οξύ το οποίο παράγεται κατά κύριο λόγο ως μεταβολικό προϊόν από τους

ελαιογόνους ζυγομύκητες (Aggelis et al., 1988, 1990, Ratledge, 1994, 2002, Fakas et al., 2006, 2007, 2008, Αγγελής, 2007) και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των αντικαρκινικών και αντιφλεγμονώδων ιδιοτήτων που έχει βρεθεί ότι περιέχει (Certik and Shimizu, 1999).

Το κυρίαρχο κλάσμα των μικροβιακών αποθησαυριστικών λιπιδίων συνίσταται από τριγλυκερίδια, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 55-80% (w/w) του συνολικού κυτταρικού λίπους (Papanikolaou et al., 2001, Fakas et al., 2006, 2007). Τα μικροβιακά τριγλυκερίδια είναι φυτικού τύπου, δηλαδή η θέση sn2 της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένη με ακόρεστο λιπαρό οξύ (Ratledge, 1994, Ratledge, 2004).

Για την παραγωγή μικροβιακών ελαίων πλούσιων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται ποικίλοι μικροοργανισμοί όπως μύκητες. Οι μύκητες που έχουν προσελκύσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον των ερευνητών για την βιοτεχνολογική παραγωγή απαραίτητων λιπαρών οξέων σε βιομηχανική κλίμακα, είναι οι Ζυγομύκητες που ανήκουν στην τάξη των *Mucorales* (Certik and Shimizu, 1999, Dyal and Narine, 2005). Ειδικότερα, οι μύκητες του γένους *Mortierella* (*M. alpina*, *M. elongata*, *M. hyaline*) αποτελούν πηγές παραγωγής λιπαρών οξέων C20 (αραχιδονικό οξύ, εικοσιπεντενοϊκό οξύ), ενώ οι μύκητες του γένους *Micromucor* θεωρούνται κατάλληλοι για την συσσώρευση C18 λιπαρών οξέων (α-λινολενικό οξύ, γ-λινολενικό οξύ). Φαίνεται μάλιστα ότι στα στελέχη που έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες μικροβιακού λίπους, το τελευταίο περιέχει μικρές ποσότητες γ-λινολενικού οξέος, ενώ τα στελέχη δυνάμενα να παράγουν μεγάλες ποσότητες γ-λινολενικού οξέος, συσσωρεύουν σχετικά μικρές ποσότητες λίπους (Certik and Shimizu, 1999).

Ένα εξίσου σημαντικό κεφάλαιο στην παραγωγή μικροβιακού λίπους, αποτελεί η χρήση διαφόρων ετερότροφων μικροφυκών για τον σκοπό αυτό. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, το εδοκυτταρικό λίπος πολλών ετερότροφων μικροφυκών είναι πλούσιο σε ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα (π.χ. το μικροφύκος *Schizochytrium limacinum* καλλιεργήθηκε σε βιομηχανική γλυκερόλη, για την παραγωγή DHA και συσσωρεύσε έως 100mg/L εικοσιδίοξεαενοϊκό οξύ (C22:6 ω-3), (Chi et al., 2007)). Οι εν λόγω μικροοργανισμοί έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων ως μια πιθανή εναλλακτική πηγή απαραίτητων λιπαρών οξέων, κατάλληλα προς βρώση. Το κίνητρο για την διερεύνηση αυτής της πιθανότητας ήταν οι αμφιβολίες όσον αφορά στην χρήση ιχθυελαίων ως συμπληρώματα διατροφής (και επομένως πηγές ω-3 λιπαρών οξέων όπως το DHA), δεδομένης της παρουσίας

ρυπογόνων ενώσεων εξαιτίας της ανθρωποκεντρικής δραστηριότητας (διοξίνες, PCBs, βαρέα μέταλλα) εντός των ιστών των ψαριών και κατ' επέκταση των ιχθυελαίων (Ratledge, 2004).

Πίνακας 1.1. Συμβατικές και μικροβιακές πηγές παραγωγής διαφόρων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs)

Λιπαρά οξέα	Συμβατικές πηγές	Μικροβιακές Πηγές
γ-Λινολενικό οξύ (GLA) C18:3 ω-6	Φυτά (<i>Oenothera biennis</i> , <i>Borago officinalis</i> , <i>Ribes nigrum</i>)	Μύκητες (<i>Mucor spp.</i> , <i>Mortierella spp.</i> , <i>Cunninghamella spp.</i>)
Αραχιδονικό οξύ (ARA) C20:4 ω-6	Ζωικοί ιστοί Ψάρια	Μύκητες (κυρίως <i>Mortierella spp.</i>) Μικροφύκη (<i>Porphyridium cruentum</i>)
Εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA) C20:5 ω-3	Ψάρια Οστρακοειδή	Μύκητες (<i>Mortierella spp.</i>) Μικροφύκη
Εικοσιδυοπεντενοϊκό οξύ (DPA) C 22:5 ω-6	Ψάρια	Μύκητες (<i>Schyzochytrium sp.</i>)
Εικοσιδύοεξαενοϊκό οξύ (DHA) C22:6 ω-3	Ψάρια Οστρακοειδή	Μύκητες (<i>Thraustochytrium spp.</i>) Μικροφύκη (<i>Cryptocodinium cohnii</i>)

Πηγή: Certik and Shimizu,1999, Van Beelen et al.,2007

Η εκάστοτε σύνθεση του μικροβιακού λίπους είναι αποτέλεσμα γενετικών, αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων για κάθε ελαιογόνο μικροοργανισμό (Ratledge, 2004). Ωστόσο, ο κύριος λόγος ενδιαφέροντος για τα μικροβιακά έλαια έγκειται στην δυνατότητά τους να υποκαταστήσουν φυτικά ή ζωικά λίπη εξεζητημένης σύστασης και δομής, όπως έλαια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώμενα στην φύση ή λίπη εξεζητημένης δομής τριγλυκεριδίων όπως το λίπος του κακάο.

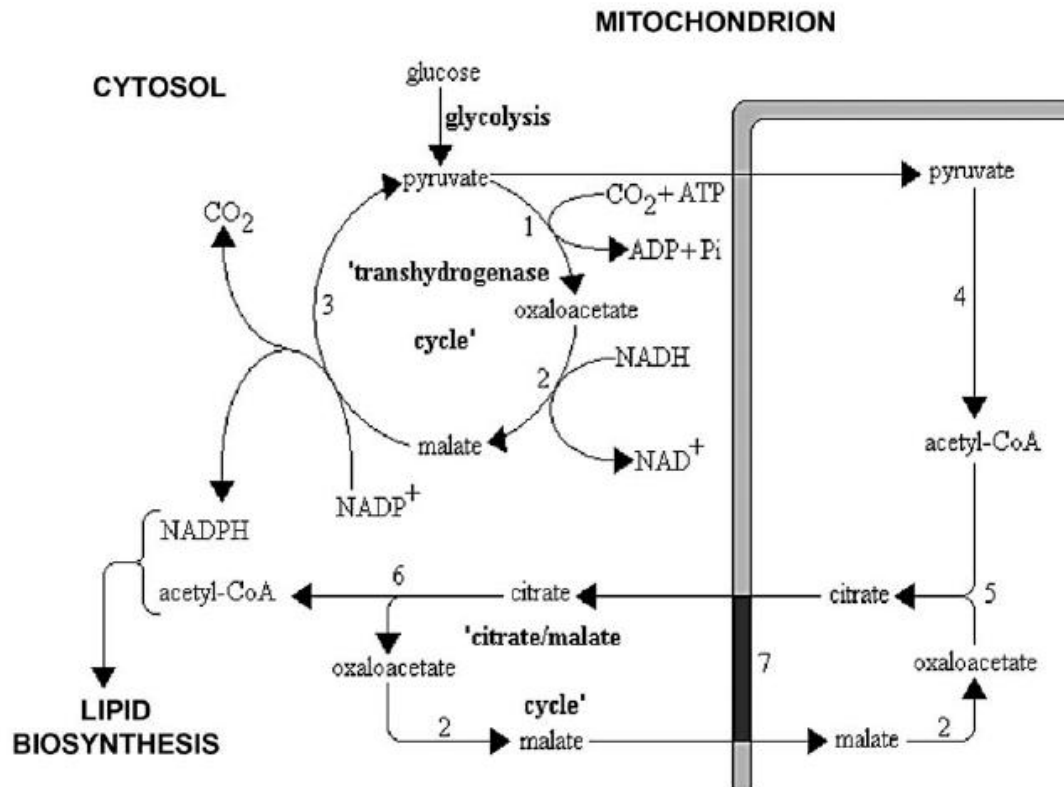
Παρότι η παραγωγή μικροβιακού λίπους προτείνεται εδώ και χρόνια ως εναλλακτική της χρήσης φυτικών ελαίων και ζωικού λίπους, πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά σε βιομηχανική κλίμακα μόλις το 1985 και διήρκησε μόνο έξι χρόνια, γιατί τελικά δεν θεωρήθηκε

συμφέρουσα οικονομικά. Το πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) και κυρίως σε γ-λινολενικό οξύ (GLA, 18:3, n-6) μικροβιακό λίπος παραγόταν από τον μύκητα *Mucor circinelloides*, με σκοπό να αποτελέσει στην αγορά εναλλακτική επιλογή του ακριβού ελαίου του φυτού ηράνθεμου. Παρότι η βιομηχανική αυτή παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους δεν διήρκησε πολλά χρόνια, εντούτοις απέδειξε ότι η χρήση μικροβιακού λίπους ως εναλλακτική της χρήσης φυτικών και ζωικών λιπαρών είναι πρακτικώς δυνατή και ότι η παραλαβή και επεξεργασία του μικροβιακού λίπους μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση συμβατικής τεχνολογίας, χωρίς να είναι αναγκαία η χρήση ακριβού και εξειδικευμένου εξοπλισμού (Ratledge, 2004). Έτσι, μέσα στα επόμενα χρόνια εντάθηκε το ενδιαφέρον για βιομηχανική παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους. Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 παράχθηκε σε βιομηχανική κλίμακα μικροβιακό λίπος που προσομοίαζε με αυτό του λίπους του κακάο (cocoa-butter substitute), κατά την καλλιέργεια ελαιοπαραγωγών ζυμών του είδους *Apiotrichum curvatum* στο τυρόγαλα. (Ykema et al., 1990, Ratledge, 1994, Αγγελής, 2007).

1.4 ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Προκειμένου να επιτευχθεί συσσώρευση λίπους εντός των κυττάρων του μικροοργανισμού, αναγκαία συνθήκη αποτελεί η καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε περιβάλλον με περίσσεια πηγής άνθρακα και περιορισμό σε άζωτο. Όταν το άζωτο της καλλιέργειας εξαντληθεί, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα (συνήθως γλυκόζη) μετατρέποντας την σε τριγλυκερίδια, τα οποία συσσωρεύονται εντός των κυττάρων

Οι λόγοι για τους οποίους ορισμένοι μικροοργανισμοί καθίσταται ελαιογόνοι επιμερίζονται σε δύο συνιστώσες. Η πρώτη αφορά στην δυνατότητα συνεχούς παραγωγής ακετυλοσυνενζύμου Α (Acetyl-CoA) απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου δρώντας ως ο απαραίτητος προάγγελος για την συνθετάση των λιπαρών οξέων. Η δεύτερη αφορά στην ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει επαρκείς ποσότητες NADPH, ενός βασικού αναγωγικού μέσου που συμμετέχει στον μηχανισμό βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων.



Εικόνα 1.2 Συνεισφορά του κύκλου του Krebs (transhydrogenase cycle) και του κύκλου κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle) στην παροχή ακετυλοσυνένζυμου Α (acetyl-CoA) και NADPH στην διαδικασία λιπογένεσης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1 αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2.αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP: κιτρική λύαση, 7. ενζύμο υπεύθυνο για την λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος. (Ratledge, 2004)

Κατά την εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, παρατηρείται διακοπή του κύκλου του Krebs (εικ.1.2). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου AMP-απαμινάση, η οποία καταλύει την διάσπαση του AMP σε IMP και NH_3 . Ως εκ τούτου, παρατηρείται ταχύτατη πτώση του επιπέδου του AMP και παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (Ratledge, 1994, Papanikolaou et al., 2004), και κατά συνέπεια το κιτρικό οξύ συσσωρεύεται εντός του μιτοχονδρίου. Μέσω του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος, όταν η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος υπερβεί την συγκέντρωση ανοχής, εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα. Ο σχηματισμός του ακετυλοσυνένζυμου Α (acetyl-CoA) στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποδίδεται από πολλούς ερευνητές στην παρουσία του ενζύμου ATP:κιτρική λύαση (ACL), η

οποία δεν ευρίσκεται στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge,2004). Η αντίδραση η οποία καταλύεται είναι η ακόλουθη:



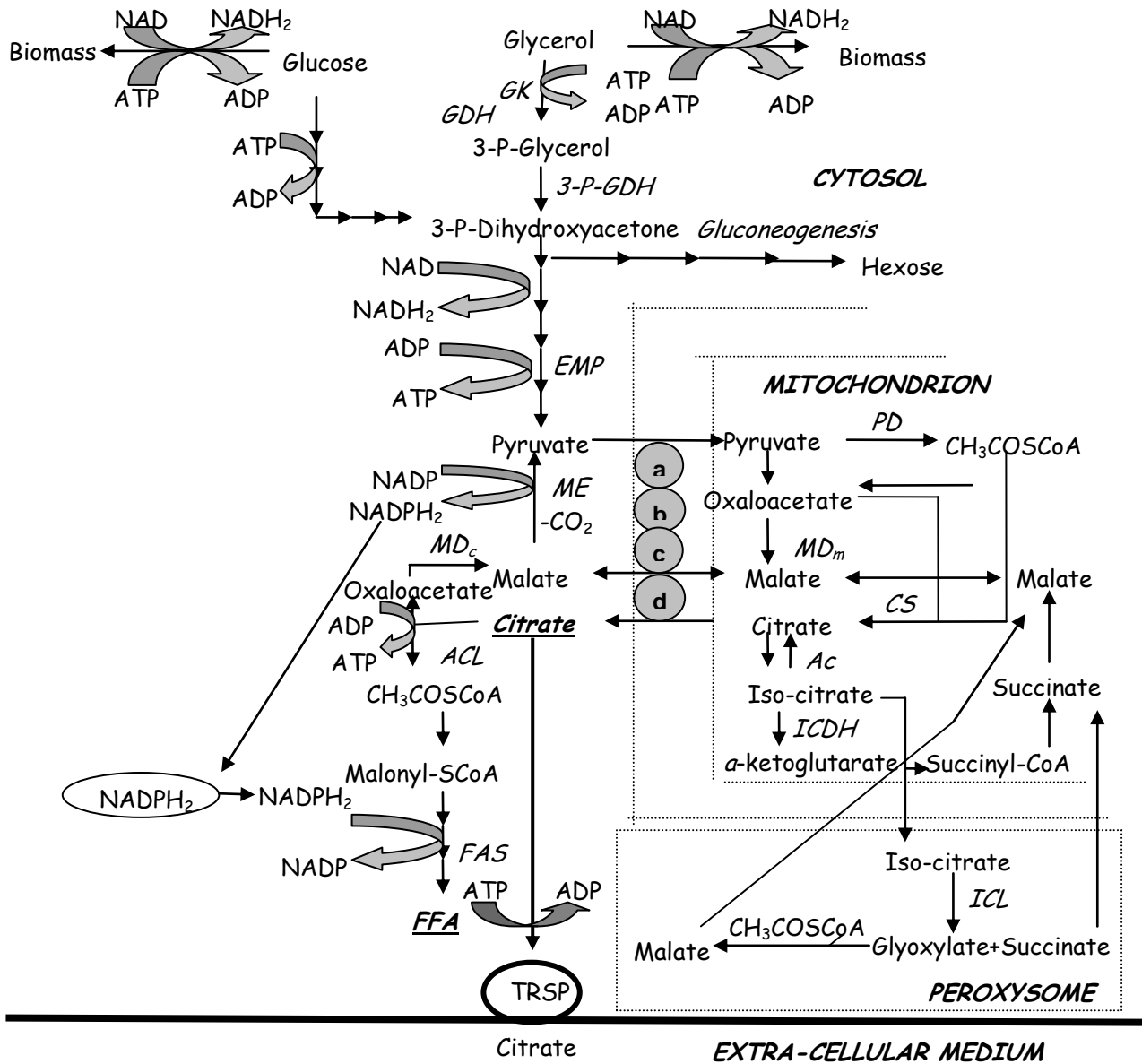
Εξίσου σημαντική είναι η συνεισφορά του μηλικού ενζύμου στην βιοσυσσώρευση λίπους ως προμηθευτής NADPH κατά την ακόλουθη αντίδραση:



Το μηλικό ένζυμο φέρεται να σχηματίζει ένα σταδιακό μεταβολικό σύμπλοκο που συνδυάζεται με την ATP:κιτρική λυάση και την συνθάση των λιπαρών οξέων, για την εξασφάλιση μιας άμεσης διόδου επικοινωνίας κατά την μετατροπή του ακετυλοσυνένζυμου Α (acetyl-CoA) σε λιπαρά οξέα, τα οποία εστεροποιούνται τελικώς με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια. Τα τελευταία ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004).

Θα πρέπει ωστόσο να επισημανθεί, ότι σε περίπτωση που το ένζυμο ATP:κιτρική λυάση απουσιάζει από έναν μικροοργανισμό ή είναι ανενεργό, η εξάντληση των αποθεμάτων αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας οδηγεί σε απέκκριση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού κιτρικού οξέος. Διαπιστώνεται λοιπόν, ότι οι διεργασίες συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους και συσσώρευσης κιτρικού οξέος, κατά τα πρώτα στάδια τους είναι βιοχημικά ταυτόσημες, και οι μικροοργανισμοί κατηγοριοποιούνται σε αυτούς οι οποίοι δύνανται να συνθέσουν λίπος και σε αυτούς οι οποίοι δύνανται να συνθέσουν κιτρικό οξύ. Ωστόσο, τουλάχιστον σε μία περίπτωση, ο ίδιος μικροοργανισμός (εν προκειμένω η ζύμη *Yarrowia lipolytica*) καλλιεργούμενος σε γλυκερόλη ως την μοναδική πηγή άνθρακα υπό συνθήκες που ευνοούσαν την σύνθεση λίπους ή/ και την παραγωγή κιτρικού οξέος (δηλαδή καλλιέργεια σε υψηλό λόγο C/N) παρήγαγε εξωκυτταρικός υψηλές ποσότητες κιτρικού οξέος κατά την ζύμωση σε φιάλες, ενώ αναπτυσσόμενος σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς ροής καλλιέργειας με υψηλή ανάδευση και αερισμό, παρήγαγε υψηλές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους (Papanikolaou et al., 2002, Papanikolaou and Aggelis, 2002). Στο παρακάτω σχήμα (εικ.1.3)

απεικονίζεται η βιοσυσσώρευση λίπους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, καθώς και η έκκριση κιτρικού οξέος κατά την καλλιέργειά τους σε γλυκόζη ή γλυκερόλη.



Εικόνα 1.3 Διάμεσος μεταβολισμός γλυκόζης και γλυκερόλης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Παραγωγή κιτρικού οξέος και/ή μικροβιακού λίπους. a,b,c: Συστήματα μεταφοράς του πυροσταφυλικού οξέος από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο και του μηλικού οξέος αντιστρόφως, d: Σύστημα μεταφοράς του κιτρικού και του μηλικού οξέος μεταξύ κυτοπλάσματος και μιτοχονδρίου. TAGs: τριγλυκερίδια, EMP: Embden-Mayerhoff-Parnas (Papanikolaou, 2008)

1.5 ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΑΕΙΦΟΡΟΥ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Μέσω της χρήσης μικροοργανισμών στην επεξεργασία αποβλήτων και υπολειμμάτων αγροτο-βιομηχανιών μπορεί να επιτευχθεί, εκτός από την απορρύπανση των αποβλήτων και παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται με χρήση των αποβλήτων ή παραπροϊόντων των βιομηχανιών αυτών ως υποστρώματα ανάπτυξης διαφόρων μικροοργανισμών, με σκοπό την παραγωγή και εκμετάλλευση μεταβολικών προϊόντων τους, όπως είναι το μικροβιακό λίπος (Single-cell oil), η μικροβιακή πρωτεΐνη (Single-cell protein), οργανικά οξέα του κύκλου του Krebs (κυρίως κιτρικό οξύ) και διάφοροι μικροβιακοί διαλύτες (κυρίως 1,3-προπανοδιόλη και ακετόνης-βουτανόλης). Εκτός αυτού, μικροοργανισμοί καλλιεργούμενοι σε βιομηχανικά απόβλητα και παραπροϊόντα μπορούν να παράξουν μία μορφή βιολογικού καυσίμου, το λεγόμενο βιοντήζελ (biodiesel). Μία ακόμη μέθοδος αξιοποίησης των βιομηχανικών υπολειμμάτων, μέσω της χρήσης μικροοργανισμών είναι η θερμόφιλη βιοαποικοδόμηση, γνωστή και ως κομποστοποίηση, μέσω της οποίας παράγονται εδαφοβελτιωτικά.

1.5.1 ΑΝΑΝΕΩΣΙΜΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑΛΛΗΛΑ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Στην μέχρι στιγμής υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει αναφερθεί χρησιμοποίηση πληθώρας ανανεώσιμων υποστρωμάτων ή υποστρωμάτων τύπου «αποβλήτων» ως πηγών άνθρακα από ελαιογόνους μικροοργανισμούς προκειμένου να παραχθεί μικροβιακό λίπος (Certik and Shimizu, 1999, Fakas et al., 2006, 2007, 2008, Αγγελής, 2007). Τα υποστρώματα αυτά διακρίνονται σε υδρόφιλα και υδρόφοβα υποστρώματα.

Στα υδρόφιλα υποστρώματα ανήκουν τα διάφορα σακχαρούχα υποστρώματα, όπως μελάσες ζαχαροκαλάμου ή τεύτλων, χυμοί φρούτων, τυρόγαλα (περιέχει 3-8% λακτόζη) και άλλα υπολείμματα ή απόβλητα βιομηχανιών πλούσια σε σάκχαρα. Επίσης, στην κατηγορία των υδρόφιλων υποστρωμάτων κατατάσσονται τα διάφορα αμυλούχα απόβλητα (όπως το απόβλητο βιομηχανίας παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη) και η ακατέργαστη βιομηχανική γλυκερόλη (ως παραπροϊόν ελαιουργικών

βιομηχανιών και βιομηχανιών παραγωγής καυσίμου τύπου «μεθυλεστέρων») (Papanikolaou and Aggelis, 2002).

Όσον αφορά τα υδρόφοβα ανανεώσιμα υποστρώματα, στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται λίπη και έλαια, συνήθως χαμηλής προστιθέμενης αξίας, όπως τα ζωικά λίπη (απόβλητα σφαγείων) και το έλαιο ελαιοκράμβης ή βιομηχανικά λιπαρά υπολείμματα και απόβλητα (π.χ. σάπωνες, στεαρίνες κ.λπ.). Επίσης, στα υδρόφοβα υποστρώματα ανήκουν διάφοροι υγροί υδρογονάνθρακες (με περισσότερα από 4 άτομα άνθρακα), η χρήση των οποίων όμως σταδιακά εγκαταλείπεται, λόγω εμφάνισης ορισμένων προβλημάτων, όπως είναι η λήψη ενίοτε πολύ χαμηλών τιμών του συντελεστή μεταφοράς οξυγόνου και η παραγωγή λίπους με ανεπιθύμητες οσμές.

Αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν θεμελιώδεις βιοχημικές διαφορές κατά την βιοσύνθεση λίπους σε σχέση το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται. Όταν την μόνη πηγή άνθρακα και ενέργειας αποτελούν υποστρώματα «τύπου σακχάρου», δηλαδή υποστρώματα που αποτελούνται από σάκχαρα ή παρομοίως μεταβολιζόμενα συστατικά (π.χ. άμυλο), η σύνθεση του μικροβιακού λίπους από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς ξεκινά μετά την εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας (το άζωτο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα της λιποσυσσώρευσης). Αντίθετα, όταν η καλλιέργεια του μικροοργανισμού πραγματοποιείται σε υπόστρωμα τύπου «λιπαρών υλικών», δηλαδή ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται κάποιο υδρόφοβο συστατικό, όπως λιπαρή ύλη ή n-αλκάνια, η λιποσυσσώρευση είναι ανεξάρτητη της πηγής αζώτου και λαμβάνει χώρα ταυτοχρόνως με την κυτταρική αύξηση (Papanikolaou et al., 2001, 2002, Papanikolaou and Aggelis, 2002). Πρέπει επίσης να σημειωθεί η αδυναμία παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους σε υποστρώματα που περιέχουν κυτταρινούχα υλικά ή μεθανόλη.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Η ζύμωση στερεής κατάστασης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την παραγωγή ακατέργαστων αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την υδρόλυση αμυλούχων αποβλήτων και συνεπώς την μετατροπή των αποβλήτων αυτών σε θρεπτικό μέσο για την παραγωγή μικροβιακού λίπους.

2.1.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Για την πραγματοποίηση της ζύμωσης στερεής κατάστασης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1, το οποίο έχει ταξινομηθεί από το Commonwealth Mycological Institute στο σύμπλεγμα των *Aspergillus niger*. Το στέλεχος αυτό αρχικά ήταν αποθηκευμένο αφυδατωμένο, υπό μορφή σπορίων σε άμμο (silica gel) μέσα σε γυάλινο φιαλίδιο, στους 4 °C (Koutinas et al., 2001). Πριν χρησιμοποιηθεί για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, το στέλεχος ενυδατώθηκε, απομονώθηκε (με την μέθοδο streaking), ώστε να εξασφαλιστεί η καθαρότητά του και αποθηκεύτηκε σε κεκλιμένους σωλήνες πληρωμένους με θρεπτικό μέσο το οποίο αποτελούνταν από 5% w/v πίτυρο σίτου και 2% w/v nutrient agar, στους 4°C. Ανανέωσή του λάμβανε χώρα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα του. Επίσης, ανανέωση του στελέχους πραγματοποιούνταν πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, έτσι ώστε το εμβόλιο να είναι σε κάθε περίπτωση ηλικίας περίπου τεσσάρων ημερών. Η ανάπτυξη του εμβολίου πραγματοποιούνταν σε επωαστικό κλίβανο (memmert) σε θερμοκρασία 30°C.

2.1.2 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ

Όλες οι καλλιέργειες του μύκητα *A. awamori* που πραγματοποιήθηκαν σε αυτή τη φάση της μελέτης ήταν σε ζυμώσεις στερεής κατάστασης, εντός κωνικών φιαλών των 250 mL. Κάθε κωνική φιάλη ήταν πληρωμένη με το θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας το οποίο αποτελούνταν από 5g πίτυρο σίτου και περίπου 65% υγρασία σε υγρή βάση. Το πίτυρο σίτου αποτελεί παραπροϊόν άλεσης σίτου και χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα και αζώτου της καλλιέργειας.

Σε κάθε μία από τις κωνικές φιάλες των 250 mL προστίθεντο 5,00g πίτυρο σίτου, ζυγισμένα με ζυγό ακριβείας (Santorius basic). Οι φιάλες αυτές πωματίζονταν με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο. Δοκιμαστικοί σωλήνες, ισάριθμοι με τις κωνικές φιάλες που θα χρησιμοποιούνταν στο εκάστοτε πείραμα ζύμωσης στερεής κατάστασης, πληρούνταν με 9,3mL απιονισμένο νερό, προς εξασφάλιση της απαιτούμενης υγρασίας της καλλιέργειας σε κάθε φιάλη και 1-2 σταγόνες του γαλακτωματοποιητή Tween 80, προς επίτευξη ομοιόμορφης διασποράς των σπορίων του μύκητα στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας κατά τον εμβολιασμό και την επώαση. Οι πληρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίζονταν με υδρόφοβο βαμβάκι, καλύπτονταν με αλουμινόχαρτο και μαζί με τις προαναφερθείσες κωνικές φιάλες αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο (121°C / 1,5atm) για 20 min.

Μετά την αποστείρωση των φιαλών και των δοκιμαστικών σωλήνων, ακολουθούσε η παραλαβή των σπορίων του μύκητα, προκειμένου να εμβολιαστεί κάθε κωνική φιάλη. Αυτό επιτυγχάνονταν με την προσθήκη του αποστειρωμένου νερού που περιέχονταν σε κάθε ένα δοκιμαστικό σωλήνα εντός του κεκλιμένου σωλήνα που περιείχε τον μύκητα, υπό ασηπτικές συνθήκες. Ακολουθούσε έντονη ανάδευση του σωλήνα (με vortex) και στη συνέχεια το εναιώρημα σπορίων που είχε δημιουργηθεί μέσα σε κάθε σωλήνα, μεταγγιζόταν σε κάθε μία από τις κωνικές φιάλες με το πίτυρο σίτου, και πάλι υπό ασηπτικές συνθήκες. Η ποσότητα του εμβολίου για κάθε φιάλη αντιστοιχούσε σε 10^6 - 10^8 cfu (Koutinas et al., 2001), γεγονός που επιβεβαιώθηκε με άμεση μικροσκοπική μέτρηση μικροβιακών κυττάρων με τη χρήση αιματοκυτομέτρου Thomas. Μετά τον εμβολιασμό, οι φιάλες τοποθετούνταν σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο (ZHWHY-211B ROCKING INCUBATOR, ZHICHENG) με ρυθμό 180 rpm και θερμοκρασία $T=30^{\circ}\text{C}$.

2.1.3 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΣΤΕΡΕΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΖΑΧΑΡΟΠΛΑΣΤΙΚΗΣ

Κατά την διάρκεια της ζύμωσης στερεής κατάστασης ο *A. awamori* παρήγαγε αμυλολυτικά (α-αμυλάσες, β-αμυλάσες και γλυκοαμυλάσες) και πρωτεολυτικά (πρωτεάσες) ένζυμα, τα οποία είναι απαραίτητα για την υδρόλυση του αμύλου και την διάσπαση πρωτεϊνικών ενώσεων (π.χ. πεπτίδια) αντιστοίχως. Η ανάπτυξη του μύκητα στον ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο διήρκησε 1-4 ημέρες.

Προκειμένου να εντοπιστεί μετά από πόσες ημέρες ζύμωσης η παραγωγή, αλλά και η ενεργότητα των ενζύμων του *A. awamori* έφταναν στο μέγιστο, εξάγονταν από τον ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο ανά 24 ώρες δύο από τις κωνικές φιάλες στις οποίες πραγματοποιούνταν η ζύμωση στερεής κατάστασης. Στις φιάλες αυτές προστίθονταν 100mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού υπό ασηπτικές συνθήκες και έπειτα οι φιάλες εισάγονταν και πάλι στον επωαστικό κλίβανο προς ανακίνηση για 30min. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιούνταν με σκοπό την δημιουργία εναιωρήματος, στο οποίο τελικά θα ήταν διαλυμένα τα ένζυμα που παρήχθησαν από τον μικροοργανισμό κατά την διάρκεια της ζύμωσης στερεής κατάστασης. Μετά την παρέλευση των 30min, οι δύο κωνικές φιάλες εξάγονταν από τον ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο και προστίθονταν σε αυτές άλλα 100mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού, ούτως ώστε ο τελικός όγκος του εναιωρήματος να ήταν 200mL.

Το περιεχόμενο της μίας από τις δύο κωνικές φιάλες μεταφερόταν ως είχε σε μπουκάλια Duran των 1000mL, ενώ το περιεχόμενο της δεύτερης φιάλης υπόκειντο σε ποσοτικό φιλτράρισμα, με σκοπό την απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους των στερεών υπολειμμάτων της ζύμωσης που είχε προηγηθεί. Στην συνέχεια, το φιλτραρισμένο εναιώρημα υπόκειντο σε φυγοκέντρωση στις 9000rpm / 7°C για 10min σε φυγόκεντρο (UNIVERSAL 320R, Hettich Zentrifugen). Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης παραλαμβάνονταν και διηθούνταν με χρήση φίλτρων τύπου Qualitative Circles Cat.No 1002 090 Grade 2, Whatman σε αντλία κενού (GELMAN LITTLE GIANT, MODEL 13156 pressure/vacuum pump). Στη συνέχεια, το διήθημα μεταφερόταν σε μπουκάλια Duran των 1000mL.

Έπειτα, σε κάθε μία από τις δύο μπουκάλια Duran προστίθεντο υπό ανάδευση στερεό απόβλητο βιομηχανίας που παράγει προϊόντα ζαχαροπλαστικής σε συγκέντρωση 100g/L. Τα 100g αποβλήτου περιέχουν 7,3g πρωτεΐνες, 1,1g λιπαρά και 86,1g υδατάνθρακες, εκ των οποίων τα 84,8g είναι άμυλο αλεύρου ορύζης και τα 1,3g

σάκχαρα. Κάθε φορά ακολουθούσε διόρθωση του pH του περιεχομένου των μπουκαλών Duran με χρήση διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCl) 5M, ούτως ώστε αυτό να κυμαίνεται γύρω στο 4,5. Το pH μετρούνταν με pH-μετρο τύπου Jenway 3020 pH meter. Έπειτα, και οι δύο μπουκάλες Duran τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο (Grant) σε θερμοκρασία 60°C υπό ανάδευση, που πραγματοποιούνταν με χρήση μαγνητικών αναδευτήρων (AGE Magnetic stirrer, VELP SCIENTIFICA), για 24 ώρες (Koutinas et al., 2001). Κατά την διάρκεια παραμονής των μπουκαλών Duran στο υδατόλουτρο, πραγματοποιούνταν υδρόλυση του αμύλου, καθώς και διάσπαση των πρωτεϊνικών ενώσεων που περιέχονταν στο στερεό απόβλητο της βιομηχανίας προϊόντων ζαχαροπλαστικής.

Αμέσως μετά την εισαγωγή των μπουκαλιών Duran στο υδατόλουτρο (χρονικό σημείο μηδέν) και ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν δειγματοληψία, ώστε να παρακολουθείται η πορεία της υδρόλυσης. Κάθε χρονική στιγμή που πραγματοποιούνταν δειγματοληψία λαμβανόταν 1mL από το περιεχόμενο της κάθε μπουκάλας Duran, το οποίο τοποθετούνταν σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf των 2mL, στον οποίο προηγουμένως είχε προστεθεί 1mL τριχλωροακετικού οξέος (TCA) 5% w/v. Ακολουθούσε σθεναρή ανάδευση (vortex). Το διάλυμα τριχλωροακετικού οξέος (CCl₃COOH), λόγω του υψηλού του pH (pH=8,2), έχει την ικανότητα να αδρανοποιεί τα ένζυμα και χρησιμοποιήθηκε κατά την δειγματοληψία για να αποκλειστεί η πιθανότητα συνέχισης της ενζυμικής δραστηριότητας και μετά τη λήψη του δείγματος. Το τριχλωροακετικό οξύ είναι πιο αποτελεσματικό όταν βρίσκεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, γι'αυτό κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης φυλασσόταν στους 4°C. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της δειγματοληψίας, το εναπομείναν εντός των μπουκαλών Duran υδρόλυμα αποθηκεύεται στους -20°C, ενώ τα ληφθέντα δείγματα υπόκειντο σε φυγοκέντρωση με φυγόκεντρο τύπου MICRO 12-24, Hettich (10000 rpm, 10 min). Τα υπερκείμενα των δειγμάτων υπόκειντο σε διάφορες χημικές αναλύσεις (κεφάλαιο 2.1.4 της παρούσας μελέτης).

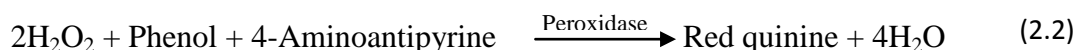
Η παραπάνω διαδικασία της ζύμωσης στερεής κατάστασης και της υδρόλυσης του στερεού αποβλήτου βιομηχανίας προϊόντων ζαχαροπλαστικής πραγματοποιήθηκε αρκετές φορές (περίπου 20), ώστε να μελετηθεί η κινητική της υδρόλυσης του αμύλου ανάλογα με την χρονική διάρκεια της ζύμωσης και ανάλογα με τις ώρες υδρόλυσης (24 ή 48 ώρες υδρόλυσης) και ώστε να παραχθεί η απαραίτητη ποσότητα υδρολύματος, που θα χρησιμοποιούνταν ως θρεπτικό υπόστρωμα για την πραγματοποίηση της ζύμωσης βουθού που ακολούθησε στην παρούσα μελέτη.

2.1.4 ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

2.1.4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης που περιέχονταν στο υδρόλυμα του αμυλούχου αποβλήτου πραγματοποιήθηκε ενζυμικά με χρήση του κιτ GLUCOSE PAP, ELITECK. Η μέθοδος στηρίζεται στην οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ και τελικά την παραγωγή έγχρωμης ένωσης (χρώματος φούξια), μέσω της οποίας προσδιορίζεται φωτομετρικά η συγκέντρωση της γλυκόζης στο δείγμα. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι οι εξής (αντιδράσεις 2.1 & 2.2):



Προετοιμασία – Παρασκευή αντιδραστηρίων

Το κιτ περιλαμβάνει: το αντιδραστήριο R1 (Phosphate buffer 100mmol/L, Phenol 10mmol/L), το αντιδραστήριο R2 (Glucose oxidase \geq 10000U/L, Peroxidase \geq 600U/L, 4-Aminoantipyrine 270 μ mol/L) και ένα πρότυπο διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 1g/L (standard). Επειδή, τόσο το κιτ, όσο και τα προς ανάλυση δείγματα φυλάσσονται υπό ψύξη, πριν τη χρήση τα αφήνουμε να λάβουν θερμοκρασία δωματίου (~20°C). Όταν το κιτ χρησιμοποιείται για πρώτη φορά τότε αρχικά πραγματοποιείται ανάμειξη των δύο αντιδραστηρίων R1 και R2 με ελαφρά ανάδευση και στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία. Μετά την παρέλευση 15min το μίγμα είναι έτοιμο προς χρήση.

Εφαρμογή της μεθόδου

Σε 10 μ L δείγματος προστίθεται 1mL από το μίγμα των αντιδραστηρίων R1 και R2 του κιτ και ακολουθεί ανάδευση με vortex. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται διάλυμα το οποίο αντί για 10 μ L δείγματος περιέχει 10 μ L απιονισμένου νερού, ενώ για την παρασκευή του προτύπου αντί για 10 μ L δείγματος χρησιμοποιούνται 10 μ L από το περιεχόμενο στο κιτ διάλυμα γλυκόζης γνωστής συγκέντρωσης (1g/L). Στην συνέχεια

τα δείγματα, ο μάρτυρας και το πρότυπο μεταφέρονται σε υδατόλουτρο (37°C) για περίπου 20 min. Στη συνέχεια, ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου (~20°C). Ακολουθεί και πάλι ανάδευση και έπειτα μέτρηση της απορρόφησης στα 500 nm με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer. Τόσο τα δείγματα όσο και το πρότυπο παρασκευάζονται εις διπλούν, με σκοπό την μείωση των σφαλμάτων κατά την φωτομέτρηση. Η συγκέντρωση του εκάστοτε δείγματος σε γλυκόζη υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο, εκφρασμένη σε g/L γλυκόζης.

$$C_{\text{δείγματος}} = (\Delta A_{\text{δείγματος}} / \Delta A_{\text{προτύπου}}) * C_{\text{προτύπου}}$$

όπου: ΔA = διαφορά απορρόφησης των δύο επαναλήψεων

$C_{\text{προτύπου}}$ = συγκέντρωση γλυκόζης πρότυπου διαλύματος (1g/L)

$C_{\text{δείγματος}}$ = συγκέντρωση γλυκόζης στο αναλυθέν δείγμα

2.1.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΥ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΑΜΙΝΟΜΑΔΩΝ

Αρχή της μεθόδου

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie, 1973).

Προετοιμασία – Παρασκευή αντιδραστηρίων

Αντιδραστήριο χρώσης (Colour reagent): Το αντιδραστήριο αυτό αποτελείται από 49,71g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5g νινυδρίνη, 3g φρουκτόζη και περίπου 60g KH_2PO_4 , διαλυμένα σε 1L απεσταγμένου νερού. Κατά την διάρκεια παρασκευής αυτού του αντιδραστηρίου το pH του διαλύματος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6,6 και 6,8. Ως εκ τούτου, όποτε κρίνεται αναγκαίο το pH διορθώνεται ούτως ώστε να κυμαίνεται εντός του προαναφερθέντος εύρους με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KH_2PO_4 στο διάλυμα. Το αντιδραστήριο χρώσης αποθηκεύεται σε μπουκάλι Duran σε θερμοκρασία 4°C.

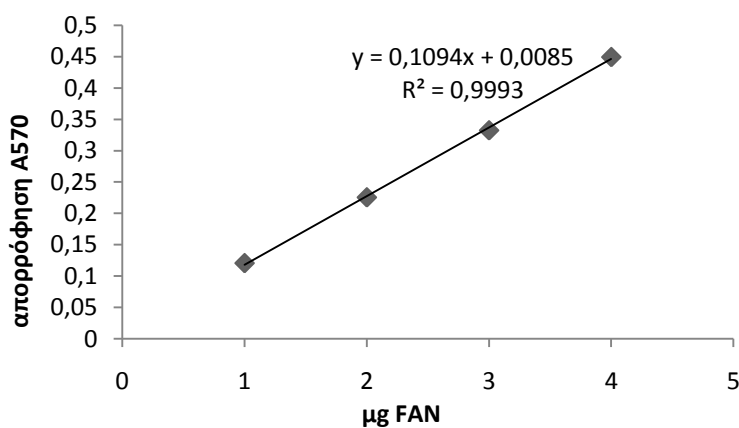
Αντιδραστήριο αραιώσης (Dilution reagent): Αρχικά 2g KIO_3 διαλύονται σε 616mL απεσταγμένου νερού. Ακολούθως, 384mL καθαρής αιθανόλης προστίθενται στο διάλυμα, το οποίο τελικά έχει όγκο 1L.

Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης (Glycine stock solution): Αυτό το διάλυμα παρασκευάζεται με διάλυση 0,1072g γλυκίνης σε 100mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C.

Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης (Glycine standard solution): Για να εξασφαλιστεί συγκέντρωση FAN 2 mg/L, 1mL αποθεματικού διαλύματος γλυκίνης διαλύεται σε 100mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C.

Εφαρμογή της μεθόδου

Αρχικά, 2mL αραιωμένου δείγματος (σε αυτήν την μελέτη χρειάστηκε τα δείγματα να αραιωθούν 40 ή 60 φορές) μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πλαστικό καπάκι (τύπου Fison 160 x 16mm). Παρασκευάστηκαν επίσης ένα πρότυπο και ένα τυφλό διάλυμα. Το πρώτο παρασκευάστηκε με προσθήκη 2mL πρότυπου διαλύματος γλυκίνης σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα και το δεύτερο με προσθήκη 2mL απιονισμένου νερού σε έναν δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα, 1mL του αντιδραστηρίου χρώσης μεταφέρθηκε σε κάθε έναν από τους παραπάνω δοκιμαστικούς σωλήνες. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο 100°C για ακριβώς 16min. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες ψύχθηκαν σε υδατόλουτρο 20°C για περίπου 20min. Έπειτα, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 5mL αντιδραστηρίου αραιώσης. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 570nm σε σύγκριση με το τυφλό διάλυμα με φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer). Η συγκέντρωση του δείγματος σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε mg FAN.



Γράφημα 2.1. Καμπύλη αναφοράς αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) με την μέθοδο νινυδρίνης.

2.1.4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ENZYMΩΝ

Το σύμπλεγμα των ενζύμων που παρήχθησαν κατά την διάρκεια της ζύμωσης στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori*, αξιοποιήθηκε ως προς την αμυλολυτική και την πρωτεολυτική του δράση. Το προαναφερθέν σύμπλεγμα ενζύμων λήφθηκε με συλλογή του (διηθημένου ή μη) υδατικού εναιωρήματος που δημιουργήθηκε με προσθήκη νερού στα στερεά της ζύμωσης στερεής κατάστασης και ανακίνησή τους για 30min (Koutinas et al., 2006).

Αμέσως μετά την έναρξη της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου που χρησιμοποιήθηκε εν όψει της παρούσας μελέτης, λήφθηκαν δείγματα 1mL υδρολύματος στο χρόνο 0 και σε χρόνο 10min μετά την έναρξη της διαδικασίας της υδρόλυσης. Η ενεργότητα των ενζύμων αναφέρεται πάντα στο χρονικό διάστημα των δέκα πρώτων λεπτών της υδρόλυσης (χρόνος αναφοράς) και σε όγκο υδρολύματος 1mL (όγκος αναφοράς).

▪ Προσδιορισμός της ενεργότητας των αμυλολυτικών ενζύμων

Το σύμπλεγμα των αμυλολυτικών ενζύμων (α-αμυλάσες, β-αμυλάσες και γλυκοαμυλάσες) θα αναφέρεται ως γλυκοαμυλάση, διότι αυτό είναι το κυρίαρχο ένζυμο του συμπλέγματος.

Ορισμός μονάδας (Unit definition): Μία μονάδα (U) ενεργότητας γλυκοαμυλάσης ορίζεται ως το ποσό της γλυκοαμυλάσης που απαιτείται για την παραγωγή 1mg γλυκόζης ανά λεπτό (min).

▪ Προσδιορισμός της ενεργότητας των πρωτεολυτικών ενζύμων

Το σύμπλεγμα των πρωτεολυτικών ενζύμων αποτελείται από πρωτεάσες.

Ορισμός μονάδας (Unit definition): Μία μονάδα (U) ενεργότητας πρωτεάσης ορίζεται ως το ποσό της πρωτεάσης που απαιτείται για την παραγωγή 1μg FAN (άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων) ανά λεπτό (min).

2.2 ΖΥΜΩΣΗ ΥΓΡΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Το υδρόλυμα που παρήχθη από την ζύμωση στερεής κατάστασης, όπως αυτή περιγράφηκε στο κεφ.2.1 της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την πραγματοποίηση υγρής ζύμωσης του ελαιογόνου μύκητα *Mortierella isabellina*. Σκοπός αυτής της ζύμωσης ήταν η παραγωγή μικροβιακού λίπους (SCO, Single Cell Oil).

2.2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Για την πραγματοποίηση της υγρής ζύμωσης του υδρολύματος των αμυλούχων αποβλήτων χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Mortierella isabellina* ATHUM 2935. Ο μύκητας αυτός ανήκει στην κλάση των ζυγομυκήτων.

Το εν λόγω στέλεχος διατηρούνταν σε κεκλιμένους σωλήνες πληρωμένους με θρεπτικό μέσο PDA (Potato Dextrose Agar) στους 4 °C, ενώ η ανανέωση τους λάμβανε χώρα ανά τακτικά διαστήματα, προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους. Επίσης, ανανέωση των στελεχών πραγματοποιούνταν πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, έτσι ώστε το εμβόλιο να είναι σε κάθε περίπτωση ηλικίας περίπου πέντε ημερών. Η ανάπτυξη του εμβολίου πραγματοποιούνταν σε επωαστικό κλίβανο (memmert) σε θερμοκρασία 30°C.

2.2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ

Η καλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε ήταν σε ζύμωση βυθού κλειστού τύπου, εντός κωνικών φιαλών των 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 τους (50±1 mL) με θρεπτικό μέσο. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα και αζώτου το υδρόλυμα των αμυλούχων αποβλήτων βιομηχανίας προϊόντων ζαχαροπλαστικής (το οποίο προέκυψε με τον τρόπο που περιγράφηκε στο κεφ. 2.1 της παρούσας μελέτης). Το υδρόλυμα πριν χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα της υγρής ζύμωσης υπόκειντο σε ποσοτικό φιλτράρισμα, φυγοκέντρωση στις

9000rpm / 7°C για 10min και διήθηση υπό κενό με χρήση αντλίας κενού, όπως ακριβώς περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.1.3 της παρούσας μελέτης. Σε όλα τα πειράματα, μαζί με την πηγή άνθρακα – αζώτου (υδρόλυμα) προσθέτονταν στο θρεπτικό μέσο και ένα μίγμα αλάτων με σύσταση όπως αυτή περιγράφεται στον ακόλουθο πίνακα (Πίν.2.1), με σκοπό την ρύθμιση του pH του μέσου καλλιέργειας ούτως ώστε μετά την αποστείρωση αυτό να ήταν 6.0 ± 0.2 .

Πίνακας 2.1 Συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό μέσο υγρής ζύμωσης.	
Συστατικά	Συγκεντρώσεις (g/L)
KH ₂ HPO ₄	7
Na ₂ HPO ₄	2.5
(Πηγή: Papanikolaou et al., 2002)	

Μετά τη ρύθμιση του pH το θρεπτικό υπόστρωμα της υγρής ζύμωσης υφίστατο αποστείρωση. Η αποστείρωση σε ορισμένα από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της μελέτης επιτεύχθηκε με φίλτρο με την βοήθεια περιστροφικής αντλίας τύπου MINIPULS 3, GILSON και με χρήση φίλτρου με πόρους διαμέτρου 0,2μm (Aqueous solution filter capsule, Whatman, POLYCAP). Πριν τη χρήση του παραπάνω συστήματος αποστείρωσης, το φίλτρο, οι σωλήνες και ο τελικός αποδέκτης (μπουκάλια Duran) του αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο (121°C / 1,5 atm, για 20 min). Έπειτα, το αποστειρωμένο με φίλτρο υπόστρωμα διαμοιραζόταν ανά 50±1mL σε αποστειρωμένες σε αυτόκλειστο κωνικές φιάλες των 250mL υπό ασηπτικές συνθήκες. Εναλλακτικά, η αποστείρωση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας πραγματοποιούνταν σε αυτόκλειστο, αφού είχε προηγηθεί πλήρωση των κωνικών φιαλών των 250mL με 50±1mL θρεπτικού μέσου. Επίσης, σε κάποια από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη το θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας υπέστη αρχικά αποστείρωση με φίλτρο και στην συνέχεια αποστείρωση σε αυτόκλειστο, με τους τρόπους που περιγράφηκαν παραπάνω. Στόχος της εφαρμογής των άνωθεν διαφορετικών τρόπων αποστείρωσης του θρεπτικού μέσου

ήταν η μελέτη της επίδρασης της αποστείρωσης σε κάποια συστατικά του μέσου (κυρίως πρωτεϊνικής φύσεως) και συνεπώς στην παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Mortierella isabellina*.

Μαζί με το συνολικό αριθμό φιαλών που προορίζονταν για αποστείρωση στο αυτόκλειστο, αποστειρώνονταν επίσης μία κωνική φιάλη των 100mL κενή και μία κωνική φιάλη των 50mL, πληρωμένη με 25mL απιονισμένο νερό. Μετά την αποστείρωση των παραπάνω φιαλών, ακολουθούσε η παραλαβή των σπορίων του χρησιμοποιούμενου μύκητα (*Mortierella isabellina*), προκειμένου να εμβολιαστεί κάθε κωνική φιάλη των 250mL η οποία προηγουμένως είχε πληρωθεί με 50±1mL υποστρώματος.. Τούτο επιτυγχάνονταν με την προσθήκη του αποστειρωμένου νερού εντός του κεκλιμένου σωλήνα που περιείχε τον μύκητα με ασηπτικές συνθήκες, και μετά από έντονη ανάδευση του σωλήνα (με χρήση Vortex), τα σπόρια του μύκητα παραλαμβάνονταν στο αιώρημα, το οποίο συλλεγόταν στην κενή κωνική φιάλη, ομοίως υπό ασηπτικές συνθήκες. Η ποσότητα του εμβολίου που αντιστοιχούσε σε κάθε μία από τις κωνικές φιάλες, στις οποίες θα πραγματοποιούνταν η καλλιέργεια του μύκητα, ήταν 1 mL και αντιστοιχούσε σε 10^5 - 10^7 cfu. Μετά τον εμβολιασμό, οι φιάλες τοποθετούνταν σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο (New Brunswick Sc, Usa, 180 rpm, 28°C) με ρυθμό 180 rpm και θερμοκρασία T=28°C.

2.2.3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

2.2.3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΛΥΜΕΝΟΥ O₂ ΚΑΙ pH

Το διαλυμένο O₂ στην καλλιέργεια μετρούνταν με φορητό οξυγονόμετρο τύπου HANNA INSTRUMENTS Waterproof DO meter. Κατά την διαδικασία της μέτρησης, το ηλεκτρόδιο τοποθετούνταν εντός της κωνικής φιάλης και η τελευταία εντός του ανακινούμενου επωαστικού κλιβάνου. Μετά την σταθεροποίηση των τιμών θερμοκρασίας και διαλυμένου οξυγόνου, που εμφανίζονταν στην οθόνη του οξυγονομέτρου (ύστερα από παρέλευση περίπου 10min) λαμβανόταν η τιμή του διαλυμένου οξυγόνου (dissolved oxygen – D.O.%). Προκειμένου να μετρηθεί ο

ειδικός ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου ($q_{O_2} - mg/mg \cdot h$), το όργανο ετίθετο στην ένδειξη mg/L και η ανάδευση διακόπτονταν. Η ταχύτητα κατανάλωσης οξυγόνου ($r_{O_2} - g/L \cdot sec$) προσδιορίζονταν από την κλίση της ευθείας $[O_2] = a \cdot t$ και διαιρώντας με την τιμή της βιομάζας που αντιστοιχούσε στο συγκεκριμένο σημείο υπολογίζονταν ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου.

Το pH της καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου Jenway 3020 pH meter. Να σημειωθεί ότι μετά την μέτρηση εκάστοτε σημείου της κινητικής, πραγματοποιούνταν διόρθωση του pH του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας στις υπόλοιπες φιάλες όποτε κρίνονταν απαραίτητο, ώστε το pH στο θρεπτικό μέσο να κυμαίνεται στην τιμή 6.0 ± 0.2 . Η διόρθωση του pH γίνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος καυστικού καλίου (KOH) 5M.

2.2.3.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Η βιομάζα συλλεγόταν με την μέθοδο του εσχарισμού, με σχάρα τύπου A.S.T.M. E-M, U.S. Standard Sieve Series, με διάμετρο πόρων 0,09mm. Με την μέθοδο αυτή το υπερκείμενο της καλλιέργειας διαπερνούσε τους πόρους της σχάρας και συλλεγόταν σε φιαλίδιο τύπου McCartney και έπειτα αποθηκευόταν υπό κατάψυξη μέχρι την στιγμή χρήσης του για την διεξαγωγή των χημικών αναλύσεων. Ακολούθησε έκπλυση των μυκηλίων με απιονισμένο νερό (τουλάχιστον τρεις φορές), προς απομάκρυνση των υπολειμμάτων του θρεπτικού μέσου, ούτως ώστε να συλλεχθεί η καθαρή βιομάζα της καλλιέργειας. Στη συνέχεια η βιομάζα μεταφερόταν σε προζυγισμένα φιαλίδια τύπου McCartney και τοποθετούνταν προς ξήρανση ($90 \pm 5^\circ C$) σε ξηραντήρα (Heraeus, W.C. HERAEUS GMBH, HANAU) μέχρι σταθερού βάρους (για περίπου 24 ώρες). Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίζόταν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων τύπου Sartorius basic και ακολούθως εκφραζόταν σε g/L .

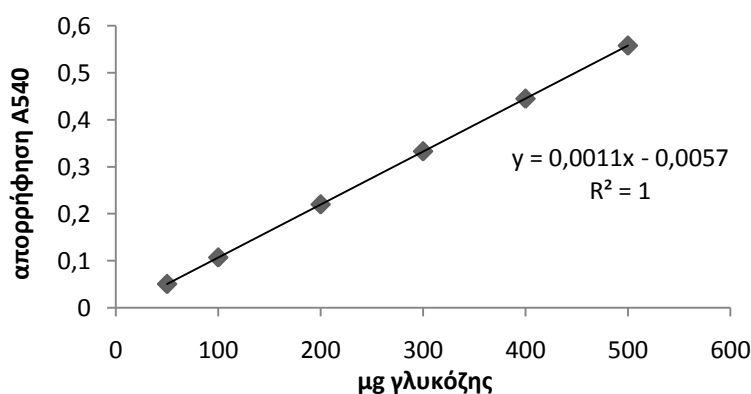
2.2.3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΟΝΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων των υπερκειμένων της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)

(Miller, 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ.

Εφαρμογή της μεθόδου

Σε 0,5 mL δείγματος προστίθεται 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS και το μίγμα αναδεύεται. Επίσης, παρασκευάζεται διάλυμα μάρτυρα, το οποίο αποτελείται από 0,5mL αντιδραστηρίου DNS και 0,5mL απιονισμένου νερού. Στην συνέχεια τόσο τα δείγματα όσο και ο μάρτυρας μεταφέρονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 100°C για 5 min ακριβώς και έπειτα ψύχονται αμέσως με H₂O (~20°C). Έπειτα προστίθενται 5mL απιονισμένο νερό. Ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 540nm. Η συγκέντρωση του δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη πρότυπη καμπύλη αναφοράς, εκφρασμένη σε μg γλυκόζης. Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.



Γράφημα 2.2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλυκόζης με την μέθοδο DNS

2.2.3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Η μέθοδος περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.1.4.1 της παρούσας μελέτης.

2.2.3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΥ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΑΜΙΝΟΜΑΔΩΝ

Η μέθοδος περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.1.4.2 της παρούσας μελέτης.

2.2.3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Εκχύλιση Λίπους

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικού λίπους που παράγεται από τον ζυγομύκητα κατά τη διάρκεια της υγρής ζύμωσης, μετά τη ζύγιση της ξηρής βιομάζας προστέθηκε ποσότητα μερικών mL μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl_3)-μεθανόλης (Methanol) σε αναλογία 2:1 (Folch et al., 1957; Papanikolaou et al., 2001). Μετά την προσθήκη του προαναφερθέντος μίγματος διαλυτών τα φιαλίδια με την ξηρή βιομάζα τοποθετούνταν σε σκότος για τουλάχιστον 4 ημέρες, ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών οξέων του ενδοκυτταρικού λίπους. Είναι προφανές ότι με το χρησιμοποιούμενο μίγμα διαλυτών εκχυλίζεται το συνολικό (total) μικροβιακό λίπος, ήτοι και τα αποθηκευτικά και τα δομικά λιπίδια. Κατόπιν η βιομάζα μαζί με το μίγμα διαλυτών υφίστατο διήθηση με ηθμό. Το διήθημα συλλέγονταν σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης και ακολουθούσε εξάτμιση, σε περιστροφικό εξεταμιστήρα (BUCHI Waterbath B-480, BUCHI Rotavapor R-114) για την απομάκρυνση των διαλυτών. Τελικά, στην φιάλη εξάτμισης παρέμενε το μικροβιακό λίπος. Αφού η φιάλη με το ενδοκυτταρικό λίπος λάμβανε θερμοκρασία δωματίου, ζυγίζόταν και κατόπιν υπολογίζονταν η συγκέντρωση του μικροβιακού λίπους σε g/L.

Μεθυλεστεροποίηση

Εν συνεχεία, το ενδοκυτταρικό λίπος μετατρέπεται με μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες (FAMES, Fat Acid Methyl Esters), με την γενικευμένη μέθοδο AFNOR (1959), προκειμένου να γίνει ο ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που περιέχονται σε αυτό, μιας και οι μεθυλεστέρες αυτοί είναι ενώσεις πτητικές. Η εστεροποίηση πραγματοποιείται σε δύο στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs, Free Fat Acids) αντιδρούν με το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου και παραλαμβάνονται οι

αντίστοιχοι σάπωνές τους. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

ο Εφαρμογή της μεθόδου

Στην σφαιρική φιάλη με το ζυγισθέν κυτταρικό λίπος προστίθενται 1-2 πέτρες βρασμού και 10 mL διαλύματος μεθανολικού νατρίου (MeO^-Na^+). Τοποθετείται το δείγμα προς βρασμό για 20 min σε κάθετο ψυκτήρα. Μετά το πέρας του χρόνου προστίθεται στο δείγμα ποσότητα υδροχλωρικής μεθανόλης (έως ότου το δείγμα αποχρωματιστεί) και αφήνεται προς βρασμό για άλλα 20 min. Ακολουθεί προσθήκη νερού προκειμένου η αντίδραση να λάβει τέλος και το δείγμα μεταφέρεται σε εκχυλιστική χοάνη. Προστίθενται 6 mL εξάνιου, το δείγμα αναδεύεται έντονα και αφήνεται για λίγα λεπτά προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (η οργανική με το εξάνιο και η υδατική φάση). Η άνω φάση, η οποία αποτελείται από τους εστέρες των λιπαρών οξέων και το εξάνιο συλλέγεται σε μικρό φιαλίδιο, στο οποίο προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου θειικού νατρίου (Na_2SO_4) προς απορρόφηση της υγρασίας, ενώ η κάτω φάση απορρίπτεται. Τέλος, το δείγμα που συλλέγεται οδηγείται στον αέριο χρωματογράφο (GC) προς ανάλυση.

Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο

Τα δείγματα που προκύπτουν από την μεθυλεστεροποίηση οδηγούνται στον αέριο χρωματογράφο για την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων στα επιμέρους λιπαρά οξέα. Πραγματοποιείται έγχυση 1-2 μL του δείγματος με ειδική σύριγγα στην υποδοχή του αέριου χρωματογράφου 8000 series FISONs.

Συνθήκες αέριου χρωματογράφου

- ο Θερμοκρασία εισαγωγή 250°C
- ο Θερμοκρασία ανιχνευτή (FID) 250°C
- ο Φέρον αέριο He (ροή 1.38 mL/min), H_2 (60 kPa), O_2 (110 kPa)
- ο Τύπος στήλης Fused silica WCOT: CP-Sill 88 (0.2 μl)
 - Μήκος 50 m
 - Διάμετρος 0.32 m
 - Πάχος επικάλυψης εσωτερικά που έρχεται σε επαφή με το δείγμα DF= 0.2 μm .

Η θερμοκρασία της στήλης παρέμενε σταθερή στους 200°C για 20 min (Fakas et al., 2006).

Με την βοήθεια πρότυπου διαλύματος που περιείχε τους μεθυλεστέρες των κυριότερων λιπαρών οξέων (βλ. Παράρτημα), ταυτοποιήθηκαν οι χρόνοι κατακράτησης των αντίστοιχων μεθυλεστέρων που περιέχονταν στο εκάστοτε αναλυθέν δείγμα. Η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος στο δείγμα των λιπιδίων υπολογίστηκε με βάση το εμβαδόν της κάθε κορυφής του αντίστοιχου χρωματογραφήματος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Aspergillus awamori* & ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΣΤΕΡΕΟΥ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ

Η ζύμωση στερεής κατάστασης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την παραγωγή αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων από τον μύκητα *Aspergillus awamori*, κατά τη διάρκεια καλλιέργειάς του σε θρεπτικό υπόστρωμα αποτελούμενο από παραπροϊόντα άλεσης σίτου (πίτυρο σίτου). Τα ακατέργαστα ένζυμα που παρήχθησαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στερεής κατάστασης χρησιμοποιήθηκαν για την υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου (κυρίως αμυλούχου) στερεού αποβλήτου βιομηχανίας παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής, με σκοπό την μετατροπή του αποβλήτου αυτού σε θρεπτικό μέσο για την παραγωγή μικροβιακού λίπους.

Η ζύμωση στερεής κατάστασης διήρκησε 1-4 ημέρες, αποτελούμενη από καλλιέργεια του μύκητα *Aspergillus awamori* σε οκτώ κωνικές φιάλες. Μετά το πέρας της ζύμωσης, στις προαναφερθείσες κωνικές φιάλες προστέθηκε νερό, με αποτέλεσμα την δημιουργία εναιωρήματος των στερεών υπολειμμάτων της ζύμωσης*. Με τη δημιουργία αυτού του εναιωρήματος το μεγαλύτερο μέρος των παραχθέντων από τον μύκητα ακατέργαστων αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων αποκολλάται από τα υπόλοιπα στερεά της ζύμωσης και μεταφέρεται στην υγρή φάση του εναιωρήματος. Ωστόσο, ένα μέρος των ενζύμων παραμένει προσκολλημένο στα στερεά που περιέχονται στο εναιώρημα. Η παραλαβή των προαναφερθέντων ενζύμων και η χρησιμοποίησή τους στην υδρόλυση του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους: α) κατόπιν απομάκρυνσης των στερεών της ζύμωσης από το εναιώρημα και β) χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης από το εναιώρημα (βλ.κεφ.2.1.3). Η υδρόλυση 100g/L του στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου έλαβε χώρα οκτώ φορές, κάθε μία από τις οποίες διήρκησε περίπου 24 ώρες και πραγματοποιήθηκε σε pH 4,5 εντός υδατόλουτρου θερμοκρασίας 60°C.

* Με τον όρο «στερεά υπολείμματα της ζύμωσης στερεής κατάστασης» εννοείται το μίγμα εναπομείναντος καταναλωθέντος θρεπτικού υποστρώματος, μικροβιακών κυττάρων και μεταβολικών προϊόντων του μικροοργανισμού που υπάρχουν στην καλλιέργεια μετά το πέρας της ζύμωσης

Στον παρακάτω πίνακα (πίν. 3.1) παρουσιάζονται συνοπτικά οι τελικές συγκεντρώσεις της γλυκόζης και του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen), καθώς και η επί % απόδοση της υδρόλυσης του αμύλου σε γλυκόζη, μετά το πέρας της υδρόλυσης του στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, σε σχέση με την διάρκεια της ζύμωσης στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori*.

Πίνακας 3.1 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων χημικών αναλύσεων του υδρολυθέντος στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου μετά το πέρας της υδρόλυσης				
Διάρκεια Ζύμωσης [ημέρες]	Συμμετοχή ή όχι των στερεών της ζύμωσης κατά την υδρόλυση	Τελική C_{Glc} [g/L]	Τελική C_{FAN} [mg/L]	Απόδοση σε γλυκόζη %
1	-	29,05	17,60	31,2
	+	34,72	28,88	37,2
2	-	85,38	103,93	68,5
	+	69,13	173,49	70,9
3	-	69,45	128,52	74,5
	+	68,23	281,44	76,0
4	-	63,54	89,49	68,1
	+	70,87	214,17	75,3

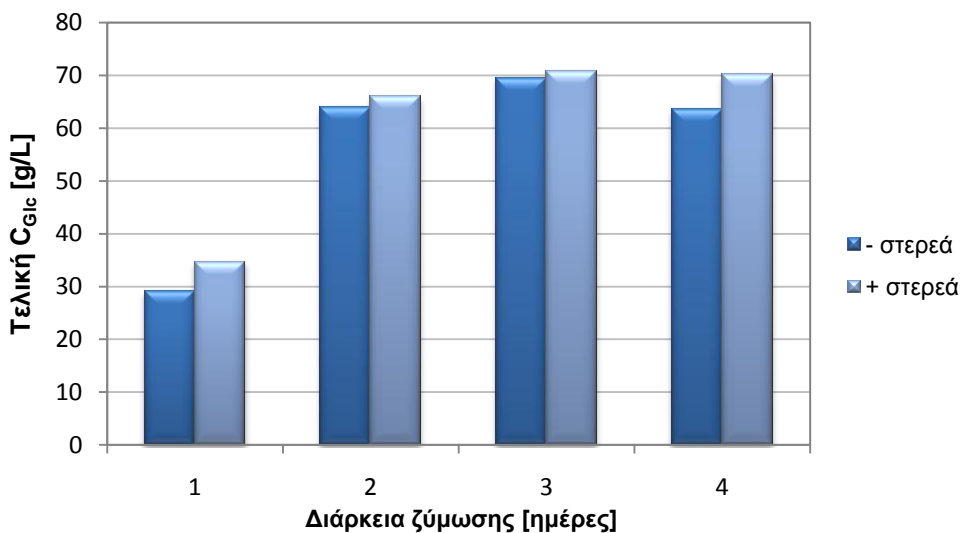
*Το σύμβολο "-" σημαίνει ότι πριν την έναρξη της διαδικασίας της υδρόλυσης τα στερεά της ζύμωσης είχαν απομακρυνθεί, ενώ το σύμβολο "+" σημαίνει ότι η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης.

Τελική C_{Glc} : Συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρόλυμα μετά το πέρας της υδρόλυσης

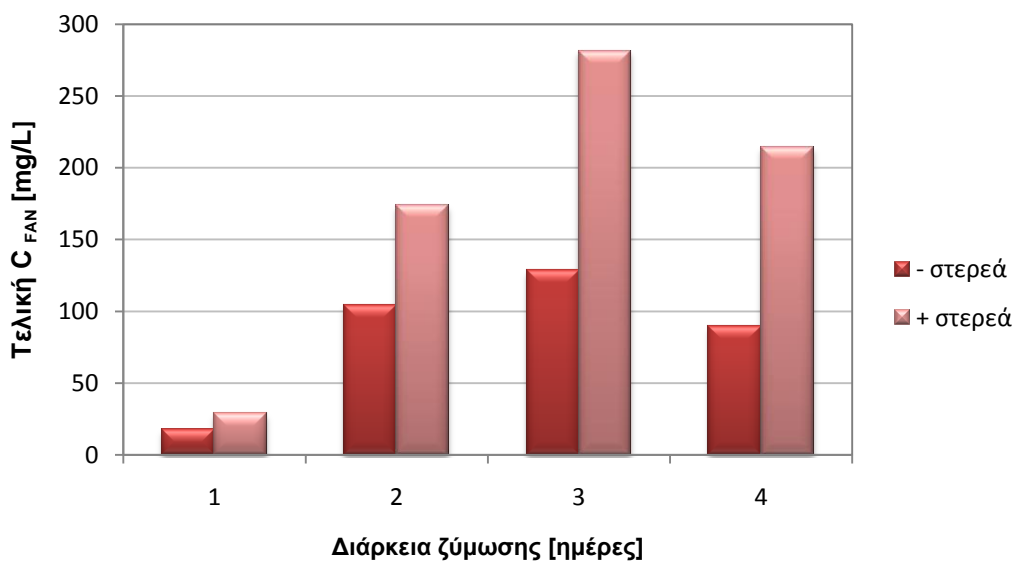
Τελική C_{FAN}: Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων στο υδρόλυμα μετά το πέρας της υδρόλυσης

Απόδοση σε γλυκόζη %: Τα γραμμάρια γλυκόζης που παράγονται κατά την υδρόλυση 100 γραμμαρίων αμύλου ορύζης.

Η περιεκτικότητα του αμυλοπρωτεϊνούχου στερεού αποβλήτου σε άμυλο ορύζης ήταν 84%w/w. Κατά την υδρόλυση, 1g αμύλου αποδίδει περίπου 1,11g γλυκόζης. Με βάση τα παραπάνω η μέγιστη θεωρητική απόδοση σε γλυκόζη που θα μπορούσε να επιτευχθεί κατά την υδρόλυση του αμύλου του απόβλητου είναι 93,24%w/w (93.24g γλυκόζης/100g αμύλου).



Διάγραμμα 3.1. Τελική συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρόλυμα μετά το πέρας της υδρόλυσης α)κατόπιν απομάκρυνσης των στερεών της ζύμωσης (- στερεά) και β)με συμμετοχή των στερεών της ζύμωσης στην υδρόλυση του αποβλήτου (+ στερεά)



Διάγραμμα 3.2. Τελική συγκέντρωση FAN στο υδρόλυμα μετά το πέρας της υδρόλυσης α)κατόπιν απομάκρυνσης των στερεών της ζύμωσης (- στερεά) και β)με συμμετοχή των στερεών της ζύμωσης στην υδρόλυση του αποβλήτου (+ στερεά)

Είναι εμφανές από τον παραπάνω πίνακα (πίν. 3.1) και τα διαγράμματα (Διάγραμμα 3.1 & Διάγραμμα 3.2) ότι, ανεξάρτητα με τη συμμετοχή ή όχι των στερεών της ζύμωσης στην υδρόλυση του αποβλήτου, οι υψηλότερες τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης αλλά και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων λήφθηκαν

όταν η ζύμωση στερεής κατάστασης του *Aspergillus awamori*, από την οποία προέρχονταν τα απαραίτητα για την υδρόλυση ένζυμα, διαρκούσε τρεις ημέρες.

Όλα τα παραπάνω καθιστούν σαφές ότι ο μύκητας *Aspergillus awamori* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στερεής κατάστασης, όπως αυτή διεξήχθη στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης (βλ. κεφ. 2.1.2), παράγει τον σύνολο τόσο των αμυλολυτικών (γλυκοαμυλάσες, α-αμυλάσες και β-αμυλάσες) όσο και των πρωτεολυτικών του ενζύμων (πρωτεάσες) εντός των τριών πρώτων ημερών της ζύμωσης, ενώ όταν η διάρκεια της ζύμωσης αυξηθεί φαίνεται τόσο η αμυλολυτική όσο και η πρωτεολυτική δράση των ενζύμων του να μειώνεται. Τα παραπάνω συμπεραίνονται από την διακύμανση που παρατηρείται στην τελική συγκέντρωση της γλυκόζης και του άζωτου των ελεύθερων αμινομάδων στο υδρόλυμα, σε σχέση με την διάρκεια της ζύμωσης, όπως αυτή εμφανίζεται στον πίνακα 3.1.

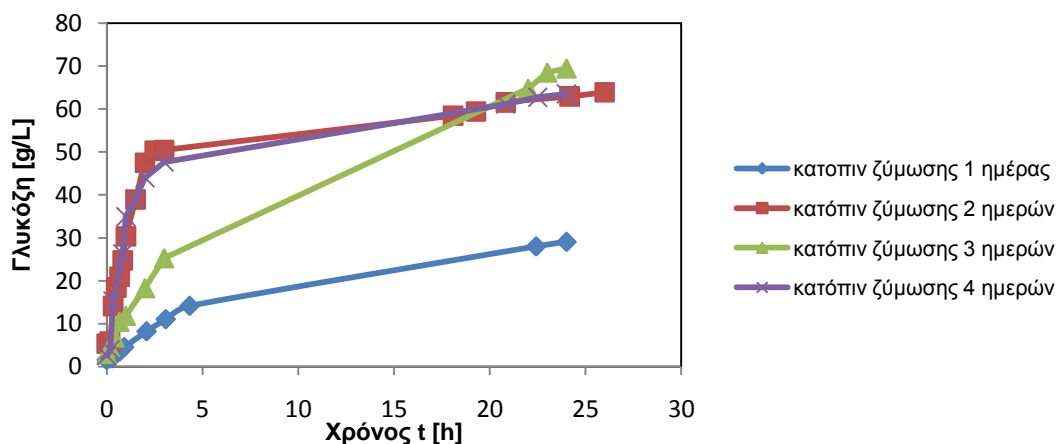
Επίσης, ανεξάρτητα από τη διάρκεια της ζύμωσης στερεής κατάστασης που είχε προηγηθεί της υδρόλυσης του αποβλήτου, πάντοτε η τελική συγκέντρωση γλυκόζης, όσο και FAN ήταν υψηλότερες στην περίπτωση που στην διαδικασία της υδρόλυσης συμμετείχαν τα στερεά της ζύμωσης, παρά όταν είχε προηγηθεί απομάκρυνση αυτών με φυγοκέντρηση και διήθηση. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι παρά την δημιουργία εναιωρήματος, με την προσθήκη νερού στα στερεά της ζύμωσης, ένα ποσοστό των ενζύμων (κυρίως των πρωτεολυτικών) συνεχίζουν να παραμένουν προσκολλημένα στα στερεά. Έτσι, όταν διενεργείται απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης πριν την υδρόλυση, χάνεται και ένα αξιόλογο, όπως φαίνεται εκ του αποτελέσματος (Διάγραμμα 3.1 & Διάγραμμα 3.2), ποσό των ενζύμων.

Κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου στερεού αποβλήτου βιομηχανίας παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής πραγματοποιούταν δειγματοληψία ανά τακτά χρονικά διαστήματα, προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα του υδρολύματος σε γλυκόζη και σε άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων με χρήση φασματοφωτομέτρου (βλ. κεφ. 2.1.4). Για να βρίσκονται όμως τα προς ανάλυση δείγματα εντός του εύρους ανίχνευσης του φασματοφωτομέτρου, καθώς και εντός της γραμμικότητας των καμπυλών αναφοράς (βλ. κεφ. 2.1.4) θεωρούνταν αναγκαία αραιώσή τους, η οποία εξαρτιόταν κάθε φορά από την μέθοδο ανάλυσης και την περιεκτικότητα του εκάστοτε δείγματος στην ουσία της οποίας επρόκειτο να προσδιοριστεί η συγκέντρωση.

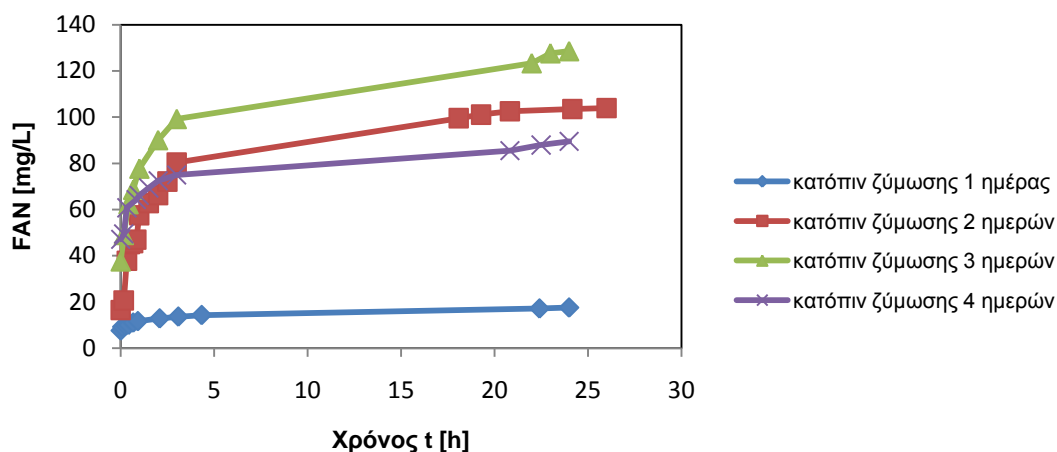
3.1.1 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ *Aspergillus awamori* ΚΑΤΟΠΙΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Στην περίπτωση που πριν την έναρξη της διαδικασίας υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου στερεού αποβλήτου αφαιρούνταν από το παρασκευασθέν εναιώρημα τα στερεά υπολείμματα της ζύμωσης στερεής κατάστασης (βλ. κεφ. 2.1.3), το διαυγές υγρό που προέκυπτε αποτελούσε υδατικό διάλυμα μεταβολιτών του μικροοργανισμού *Aspergillus awamori*, συμπεριλαμβανομένων των ακατέργαστων αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων, που είναι απαραίτητα για την πραγματοποίηση της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου στερεού αποβλήτου. Άλλα συστατικά αυτού του υδατικού διαλύματος ήταν πρωτεΐνες (ποικίλου μοριακού βάρους), πεπτίδια, κάποια ελεύθερα αμινοξέα, γλυκόζη σε μικρή συγκέντρωση (προέκυπτε από πιθανή υδρόλυση του αμύλου του θρεπτικού υποστρώματος της ζύμωσης στερεής κατάστασης από τα παραγόμενα από τον μύκητα ένζυμα) κ.α..

Στα διαγράμματα που ακολουθούν (Διάγραμμα 3.3 & Διάγραμμα 3.4) απεικονίζονται οι κινητικές των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του χρησιμοποιούμενου στην παρούσα μελέτη αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, έπειτα από απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων της ζύμωσης στερεής κατάστασης που είχε προηγηθεί.



Διάγραμμα 3.3. Κινητική της συγκέντρωσης γλυκόζης κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου κατόπιν αφαίρεσης των στερεών της ζύμωσης



Διάγραμμα 3.4. Κινητική της συγκέντρωσης FAN κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου κατόπιν αφαίρεσης των στερεών της ζύμωσης

Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα που παραθέτονται παραπάνω (Διάγραμμα 3.3 & Διάγραμμα 3.4) οι υψηλότερες τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης, αλλά και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων εντοπίστηκαν όταν της υδρόλυσης του αποβλήτου είχε προηγηθεί ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* διάρκειας τριών ημερών. Επίσης, κατά τη δειγματοληψία, η πλειοψηφία των δειγμάτων λαμβανόταν (ανεξάρτητα από την διάρκεια της ζύμωσης που είχε προηγηθεί) εντός των δύο πρώτων ωρών της υδρόλυσης, διότι σε αυτό το χρονικό διάστημα πραγματοποιούνταν η υδρόλυση του μεγαλύτερου μέρους του περιεχόμενου στο απόβλητο αμύλου σε γλυκόζη (Koutinas et al., 2001). Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις κινητικές που απεικονίζονται στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 3.3 & Διάγραμμα 3.4).

3.1.1.1 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ *Aspergillus awamori* ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΜΙΑΣ ΗΜΕΡΑΣ ΚΑΤΟΠΙΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Στην περίπτωση που η ζύμωση στερεής κατάστασης που προηγήθηκε της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου διήρκησε μόλις μία ημέρα κρίθηκε απαραίτητη μία επιπλέον αραιώση των ληφθέντων δειγμάτων της τάξης του 1:10.

Επομένως, τα δείγματα τελικά υπέστησαν αραίωση της τάξης του 1:20, αναλογιζόμενοι και εκείνη που είχαν υποστεί με την προσθήκη του TCA κατά την δειγματοληψία.

Στον παρακάτω πίνακα (πιν.3.2) παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων δειγμάτων του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, τα οποία λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του αποβλήτου. Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε γλυκόζη (ενζυμικά) και σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (με την μέθοδο της νινυδρίνης) (βλ. κεφ. 2.1.4).

Πίνακας 3.2 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων χημικών αναλύσεων του υδρολύματος του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου κατά την διάρκεια της υδρόλυσης, έπειτα από ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας μίας ημέρας

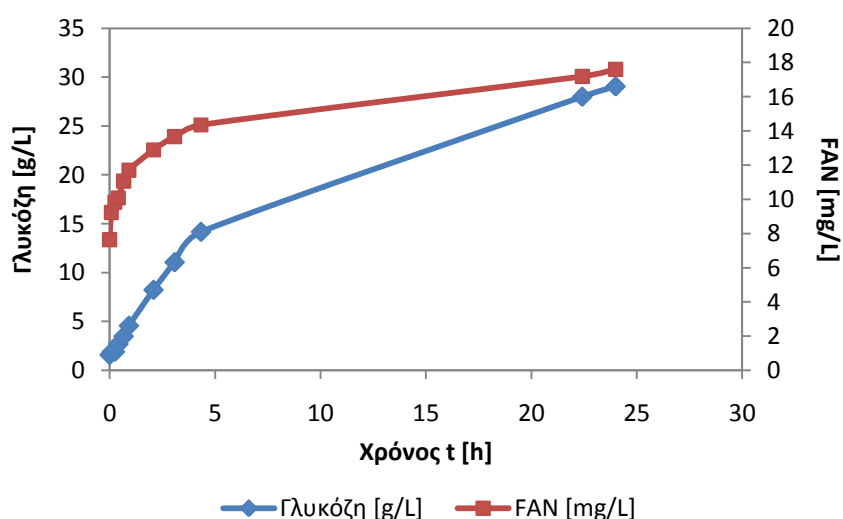
Χρόνος t [h]	Abs - 500nm	Αραίωση	Γλυκόζη [g/L]	Abs - 570nm	Αραίωση	FAN [mg/L]
0	0,03	20	1,58	0,092	20	7,63
0,08	0,035	20	1,85	0,1095	20	9,23
0,25	0,036	20	1,90	0,116	20	9,83
0,42	0,051	20	2,69	0,1188	20	10,08
0,67	0,066	20	3,48	0,1295	20	11,06
0,92	0,0865	20	4,56	0,1365	20	11,70
2,08	0,156	20	8,23	0,1495	20	12,89
3,08	0,2095	20	11,06	0,158	20	13,67
4,33	0,2685	20	14,17	0,1655	20	14,35
22,42	0,5305	20	27,99	0,1965	20	17,18
24	0,5505	20	29,05	0,201	20	17,60

Abs - 500nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 500nm
 Abs - 570nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 570nm
 FAN: άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen)

Όπως είναι φανερό από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.2) όταν είχε προηγηθεί της υδρόλυσης του στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας μίας ημέρας και πριν την έναρξη της υδρόλυσης είχαν απομακρυνθεί τα στερεά της ζύμωσης, η τελική συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρολυμένο απόβλητο έφτασε τα 29,05g/L. Αναλογιζόμενοι ότι η μέγιστη θεωρητική

απόδοση αμύλου σε γλυκόζη κατά την υδρόλυση του συγκεκριμένου αποβλήτου είναι 93,24g/L, η απόδοση που τελικά επιτεύχθηκε κατόπιν ζύμωσης στερεής κατάστασης μίας ημέρας ήταν μόλις 31%. Η χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρολυθέν απόβλητο μετά το πέρας της υδρόλυσης δικαιολογείται από το γεγονός ότι ο μικροοργανισμός (*Aspergillus awamori*) δεν είχε προλάβει να παράξει ικανή ποσότητα αμυλολυτικών ενζύμων, όταν η ζύμωση στερεής κατάστασης στην οποία υποβλήθηκε διήρκησε μόλις μία ημέρα. Έτσι δεν κατέστη δυνατή η υδρόλυση ολόκληρης της ποσότητας του περιεχόμενου στο απόβλητο αμύλου. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων του μικροοργανισμού, γεγονός που συμπεραίνεται από την μικρή τελική συγκέντρωση FAN (μόλις 17,60mg/L) στο υδρολυμένο απόβλητο. Επίσης, με βάση τους ορισμούς των μονάδων ενεργότητας γλυκοαμυλάσης και πρωτεάσης (βλ. κεφ. 2.1.4.3) η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης στην συγκεκριμένη περίπτωση υπολογίστηκε σε μόλις 0,05U, ενώ η ενεργότητα της πρωτεάσης σε 0,32U.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 3.5) απεικονίζονται οι κινητικές των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του χρησιμοποιούμενου στην παρούσα μελέτη αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, έπειτα από απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων της ζύμωσης στερεής κατάστασης που είχε προηγηθεί, όταν η διάρκεια της ζύμωσης αυτής ήταν μία ημέρα.



Διάγραμμα 3.5. Κινητική της συγκέντρωσης γλυκόζης και FAN κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου, κατόπιν αφαίρεσης των στερεών της ζύμωσης, όταν η ζύμωση αυτή είχε διαρκέσει μία ημέρα.

3.1.1.2 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ *Aspergillus awamori* ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΔΥΟ ΗΜΕΡΩΝ ΚΑΤΟΠΙΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Στην περίπτωση που η ζύμωση στερεής κατάστασης που προηγήθηκε της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου διήρκησε δύο ημέρες κρίθηκε απαραίτητο τα δείγματα που λήφθηκαν εντός των τριών πρώτων ωρών της υδρόλυσης να αραιωθούν κατά 20 φορές, ενώ όλα τα υπόλοιπα κατά 40 φορές.

Στον πίνακα που ακολουθεί (πιν.3.3) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων δειγμάτων του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, τα οποία λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του αποβλήτου. Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητα τους σε γλυκόζη (ενζυμικά) και σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (με την μέθοδο της νινυδρίνης) (βλ. κεφ. 2.1.4).

Πίνακας 3.3 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων χημικών αναλύσεων του υδρολύματος του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου κατά την διάρκεια της υδρόλυσης, έπειτα από ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας δύο ημερών

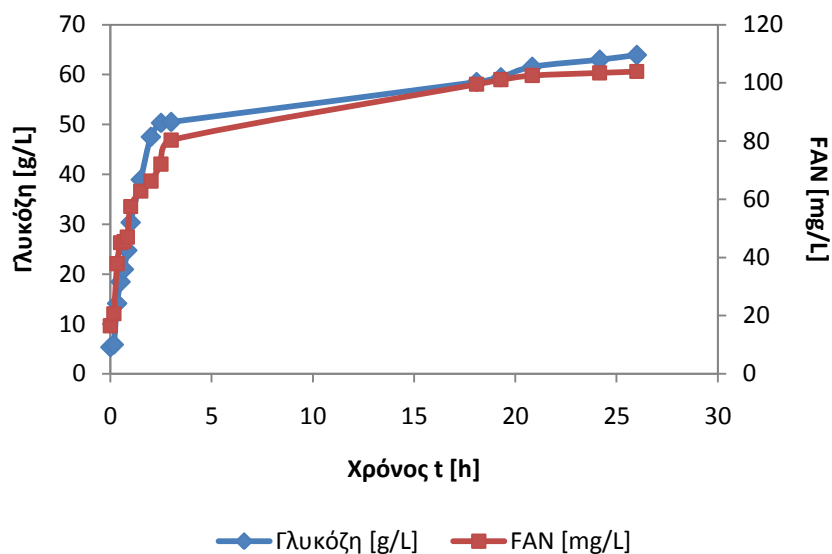
Χρόνος t [h]	Abs - 500nm	Αραίωση	Γλυκόζη [g/L]	Abs - 570nm	Αραίωση	FAN [mg/L]
0	0,1015	20	5,36	0,0989	20	16,53
0,17	0,111	20	5,86	0,1215	20	20,66
0,33	0,2675	20	14,12	0,2155	20	37,84
0,5	0,3495	20	18,44	0,255	20	45,06
0,67	0,397	20	20,95	0,2575	20	45,52
0,83	0,469	20	24,75	0,2655	20	46,98
1	0,575	20	30,34	0,323	20	57,50
1,5	0,7375	20	38,92	0,352	20	62,80
2	0,9	20	47,49	0,371	20	66,27
2,5	0,953	20	50,29	0,403	20	72,12
3	0,9565	20	50,47	0,448	20	80,35
18,08	0,554	40	58,47	0,553	40	99,54
19,28	0,563	40	59,42	0,5615	40	101,10
20,83	0,583	40	61,53	0,5695	40	102,56
24,17	0,5965	40	62,96	0,5745	40	103,47
26	0,6055	40	63,91	0,577	40	103,93

Abs - 500nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 500nm
 Abs - 570nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 570nm
 FAN: άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen)

Όπως γίνεται αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.3) όταν είχε προηγηθεί της υδρόλυσης του στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας δύο ημερών και πριν την έναρξη της υδρόλυσης είχαν απομακρυνθεί τα στερεά της ζύμωσης, η τελική συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρολυμένο απόβλητο ήταν 63,91g/L. Αναλογιζόμενοι ότι η μέγιστη θεωρητική απόδοση αμύλου σε γλυκόζη κατά την υδρόλυση του συγκεκριμένου αποβλήτου είναι 93,24g/L, η απόδοση που τελικά επιτεύχθηκε κατόπιν ζύμωσης στερεής κατάστασης δύο ημερών ήταν 69%, δηλαδή υπερδιπλάσια αυτής που επιτεύχθηκε μετά από ζύμωση μίας ημέρας (31%). Αυτό σημαίνει ότι ο μύκητας *Aspergillus awamori* παράγαγε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα αμυλολυτικών ενζύμων όταν η ζύμωση στερεής κατάστασης στην οποία υποβλήθηκε διήρκησε δύο ημέρες, σε σχέση με την περίπτωση που η ζύμωση αυτή διήρκησε μόλις μία ημέρα. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων του μικροοργανισμού, γεγονός που συμπεραίνεται από την μεγάλη διαφορά των τελικών συγκεντρώσεων FAN στο υδρολυμένο απόβλητο μετά από δύο μέρες ζύμωσης (103,93mg/L) και μετά από μία μέρα ζύμωσης (μόλις 17,60mg/L).

Επίσης, με βάση τους ορισμούς των μονάδων ενεργότητας γλυκοαμυλάσης και πρωτεάσης (βλ. κεφ. 2.1.4.3) η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης στην συγκεκριμένη περίπτωση υπολογίστηκε σε μόλις 0,05U (όπως και στην περίπτωση που τα ένζυμα προέρχονταν από ζύμωση στερεής κατάστασης μίας ημέρας), ενώ η ενεργότητα της πρωτεάσης σε 0,41U.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 3.6) απεικονίζονται οι κινητικές των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του χρησιμοποιούμενου στην παρούσα μελέτη αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, έπειτα από απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων της ζύμωσης στερεής κατάστασης που είχε προηγηθεί, όταν η διάρκεια της ζύμωσης αυτής ήταν δύο ημέρες.



Διάγραμμα 3.6. Κινητική της συγκέντρωσης γλυκόζης και FAN κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου, κατόπιν αφαίρεσης των στερεών της ζύμωσης, όταν η ζύμωση αυτή είχε διαρκέσει δύο ημέρες.

3.1.1.3 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ *Aspergillus awamori* ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΤΡΙΩΝ ΗΜΕΡΩΝ ΚΑΤΟΠΙΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Όταν της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου προηγήθηκε ζύμωση στερεής κατάστασης του *Aspergillus awamori*, η οποία διήρκησε τρεις ημέρες κρίθηκε απαραίτητο τα δείγματα που λήφθηκαν κατά την διάρκεια της υδρόλυσης να αραιωθούν κατά 40 φορές.

Στον παρακάτω πίνακα (πιν.3.4) παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων δειγμάτων του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, τα οποία λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του αποβλήτου. Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε γλυκόζη (ενζυμικά) και σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (με την μέθοδο της νινυδρίνης) (βλ. κεφ. 2.1.4).

Πίνακας 3.4 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων χημικών αναλύσεων του υδρολύματος του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου κατά την διάρκεια της υδρόλυσης, έπειτα από ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας τριών ημερών

Χρόνος t [h]	Abs - 500nm	Αραιώση	Γλυκόζη [g/L]	Abs - 570nm	Αραιώση	FAN [mg/L]
0	0,0285	40	3,01	0,214	40	37,57
0,17	0,043	40	4,54	0,2765	40	48,99
0,42	0,0645	40	6,81	0,3495	40	62,34
0,67	0,099	40	10,45	0,3835	40	68,56
1	0,1125	40	11,87	0,4335	40	77,70
2	0,1735	40	18,31	0,501	40	90,04
3	0,2395	40	25,28	0,551	40	99,18
22	0,6135	40	64,75	0,683	40	123,31
23	0,649	40	68,50	0,7065	40	127,61
24	0,658	40	69,45	0,7115	40	128,52

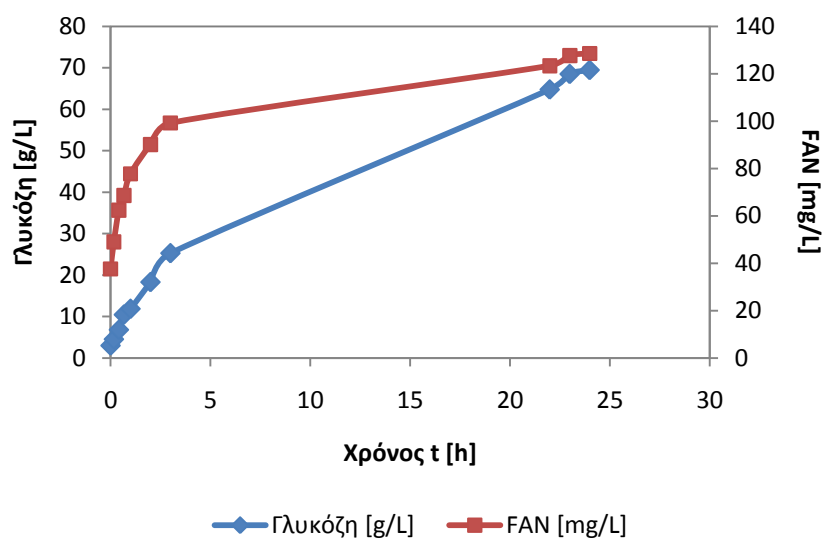
Abs - 500nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 500nm
 Abs - 570nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 570nm
 FAN: άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen)

Όπως γίνεται αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.4) όταν είχε προηγηθεί της υδρόλυσης του στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας τριών ημερών και πριν την έναρξη της υδρόλυσης είχαν απομακρυνθεί τα στερεά της ζύμωσης, η τελική συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρολυμένο απόβλητο έφτασε τα 69,45g/L. Αναλογιζόμενοι ότι η μέγιστη θεωρητική απόδοση αμύλου σε γλυκόζη κατά την υδρόλυση του συγκεκριμένου αποβλήτου είναι 93,24g/L, η απόδοση που τελικά επιτεύχθηκε κατόπιν ζύμωσης στερεής κατάστασης τριών ημερών ήταν 74%, δηλαδή μεγαλύτερη τόσο αυτής που επιτεύχθηκε μετά από ζύμωση μίας ημέρας (31%), όσο και αυτής που επιτεύχθηκε κατόπιν ζύμωσης δύο ημερών (69%). Αυτό σημαίνει ότι ο μύκητας *Aspergillus awamori* παράγαγε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα αμυλολυτικών ενζύμων όταν η ζύμωση στερεής κατάστασης στην οποία υποβλήθηκε διήρκησε τρεις ημέρες. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων του μικροοργανισμού, γεγονός που

συμπεραίνεται από την μεγάλη διαφορά των τελικών συγκεντρώσεων FAN στο υδρολυμένο απόβλητο μετά από τρεις ημέρες ζύμωσης (128,52mg/L) και μετά από δύο (103,93mg/L) ή μία ημέρα ζύμωσης (μόλις 17,60mg/L).

Επίσης, με βάση τους ορισμούς των μονάδων ενεργότητας γλυκοαμυλάσης και πρωτεάσης (βλ. κεφ. 2.1.4.3) η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης στην συγκεκριμένη περίπτωση υπολογίστηκε σε 0,15U, ενώ η ενεργότητα της πρωτεάσης ανήλθε σε 1,14U. Τόσο οι τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης και FAN, όσο και οι ενεργότητες των δύο ενζύμων ήταν οι υψηλότερες που επιτεύχθηκαν σε αυτό το πείραμα στερεής ζύμωσης, όταν πριν από την υδρόλυση του αποβλήτου απομακρύνθηκαν τα στερεά της ζύμωσης.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 3.7) απεικονίζονται οι κινητικές των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του χρησιμοποιούμενου στην παρούσα μελέτη αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, έπειτα από απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων της ζύμωσης στερεής κατάστασης που είχε προηγηθεί, όταν η διάρκεια της ζύμωσης αυτής ήταν τρεις ημέρες.



Διάγραμμα 3.7. Κινητική της συγκέντρωσης γλυκόζης και FAN κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου, κατόπιν αφαίρεσης των στερεών της ζύμωσης, όταν η ζύμωση αυτή είχε διαρκέσει τρεις ημέρες.

3.1.1.4 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ *Aspergillus awamori* ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΗΜΕΡΩΝ ΚΑΤΟΠΙΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Στην περίπτωση που προηγήθηκε της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου ζύμωση στερεής κατάστασης του *Aspergillus awamori*, η οποία διήρκεσε τέσσερις ημέρες κρίθηκε απαραίτητο τα δείγματα που λήφθηκαν κατά την διάρκεια της υδρόλυσης να αραιωθούν κατά 40 φορές.

Στον πίνακα που ακολουθεί (πιν.3.5) παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων δειγμάτων του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, τα οποία λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του αποβλήτου. Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητα τους σε γλυκόζη (ενζυμικά) και σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (με την μέθοδο της νινυδρίνης) (βλ. κεφ. 2.1.4).

Πίνακας 3.5 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων χημικών αναλύσεων του υδρολύματος του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου κατά την διάρκεια της υδρόλυσης, έπειτα από ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας τεσσάρων ημερών

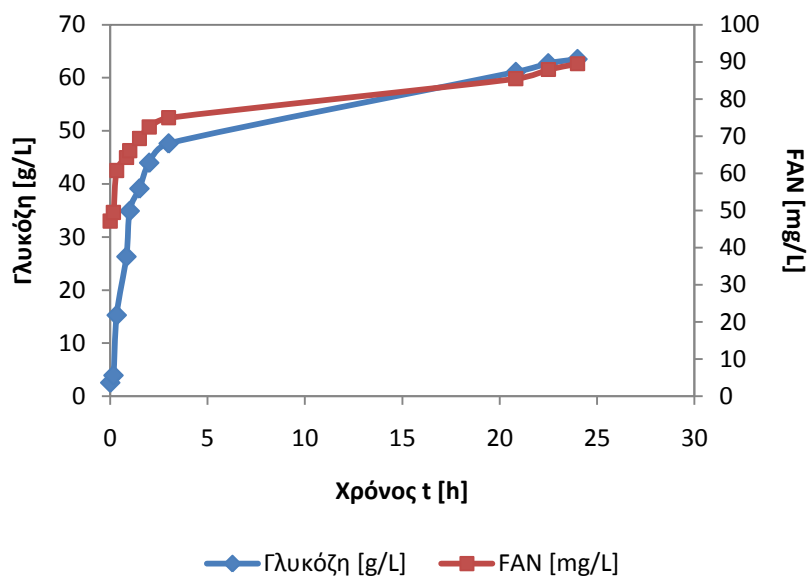
Χρόνος t [h]	Abs - 500nm	Αραίωση	Γλυκόζη [g/L]	Abs - 570nm	Αραίωση	FAN [mg/L]
5	0,0245	40	2,59	0,2665	40	47,17
0,17	0,0375	40	3,96	0,279	40	49,45
0,33	0,145	40	15,30	0,341	40	60,79
0,83	0,2495	40	26,33	0,36	40	64,26
1	0,331	40	34,93	0,37	40	66,09
1,5	0,371	40	39,16	0,388	40	69,38
2	0,417	40	44,01	0,405	40	72,49
3	0,4515	40	47,65	0,4185	40	74,95
20,83	0,579	40	61,11	0,476	40	85,47
22,5	0,5945	40	62,74	0,4895	40	87,93
24	0,602	40	63,54	0,498	40	89,49

Abs - 500nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 500nm
 Abs - 570nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 570nm
 FAN: άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen)

Από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.5) είναι φανερό ότι όταν είχε προηγηθεί της υδρόλυσης του στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας τεσσάρων ημερών και πριν την έναρξη της υδρόλυσης είχαν απομακρυνθεί τα στερεά της ζύμωσης, η τελική συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρολυμένο απόβλητο ήταν 63,54g/L. Αναλογιζόμενοι ότι η μέγιστη θεωρητική απόδοση αμύλου σε γλυκόζη κατά την υδρόλυση του συγκεκριμένου αποβλήτου είναι 93,24g/L, η απόδοση που τελικά επιτεύχθηκε κατόπιν ζύμωσης στερεής κατάστασης τεσσάρων ημερών ήταν 68%. Επίσης, η τελική συγκέντρωση FAN έφτασε τα 89,49mg/L. Τόσο η τελική συγκέντρωση της γλυκόζης, όσο και του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) στο υδρολυμένο απόβλητο, ήταν χαμηλότερη από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις όταν τα ένζυμα είχαν προέλθει από ζύμωση τριών ημερών. Από το γεγονός αυτό γίνεται αντιληπτό ότι στην περίπτωση που ο μύκητας *Aspergillus awamori* υποβλήθηκε σε ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας τεσσάρων ημερών η δράση τόσο των αμυλολυτικών αλλά κυρίως των πρωτεολυτικών του ενζύμων μειώθηκε.

Επίσης, με βάση τους ορισμούς των μονάδων ενεργότητας γλυκοαμυλάσης και πρωτεάσης (βλ. κεφ. 2.1.4.3) η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης στην συγκεκριμένη περίπτωση υπολογίστηκε σε 0,14U και της πρωτεάσης σε 0,23U, ενώ στην περίπτωση που τα ένζυμα είχαν προέλθει από ζύμωση τριών ημερών οι ενεργότητες των προαναφερθέντων ενζύμων ήταν 0,15U και 1,14U αντίστοιχα.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 3.8) απεικονίζονται οι κινητικές των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του χρησιμοποιούμενου στην παρούσα μελέτη αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, έπειτα από απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων της ζύμωσης στερεής κατάστασης που είχε προηγηθεί, όταν η διάρκεια της ζύμωσης αυτής ήταν τέσσερις μέρες.

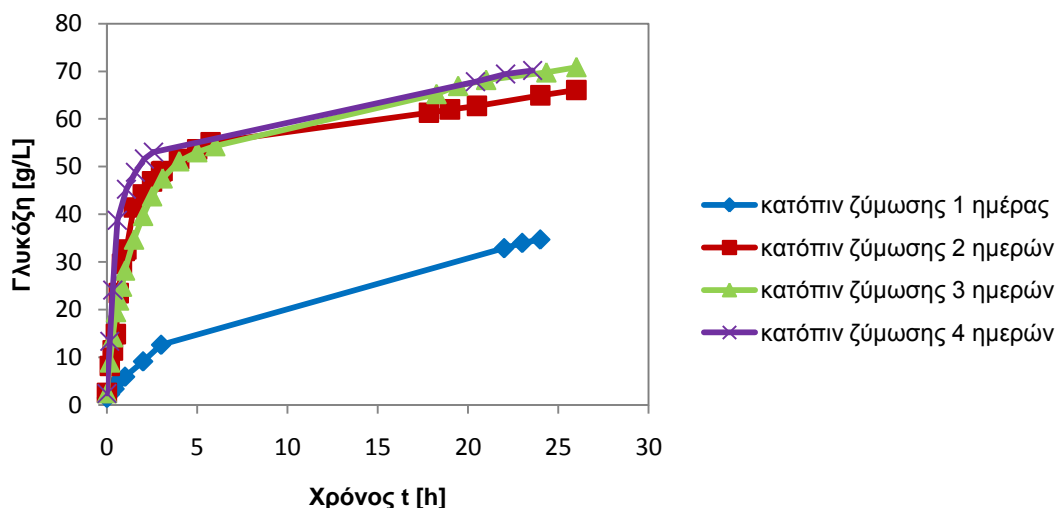


Διάγραμμα 3.8. Κινητική της συγκέντρωσης γλυκόζης και FAN κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου, κατόπιν αφαίρεσης των στερεών της ζύμωσης, όταν η ζύμωση αυτή είχε διαρκέσει τέσσερις ημέρες.

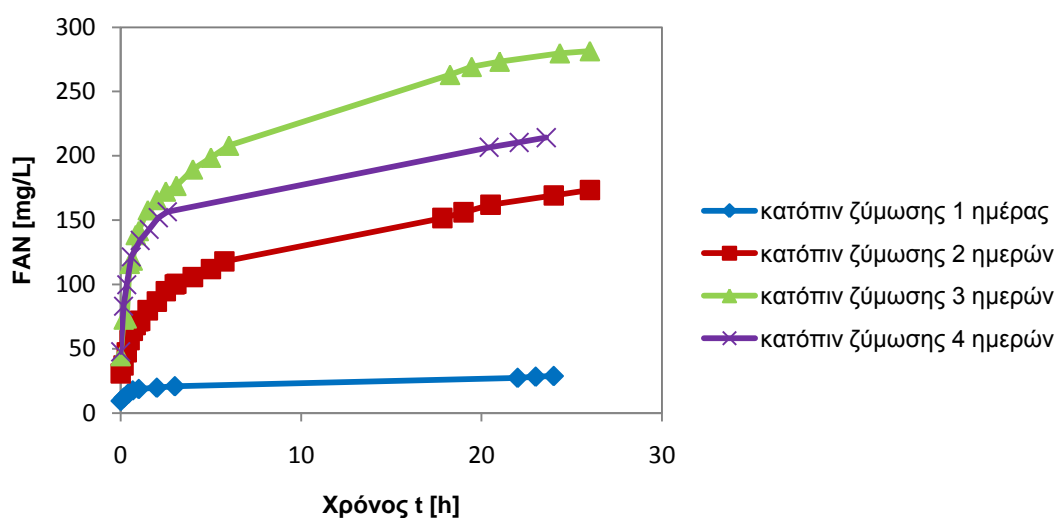
3.1.2 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ *Aspergillus awamori* ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης εξετάστηκε επίσης η περίπτωση κατά την οποία στην διαδικασία της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου στερεού αποβλήτου προστίθετο ως είχε το παρασκευασθέν εναιώρημα των στερεών υπολειμμάτων της ζύμωσης στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* (βλ. κεφ. 2.1.3). Στην περίπτωση αυτή επιτυγχανόταν παραλαβή και συνεπώς συμμετοχή στην υδρόλυση του αποβλήτου, ολόκληρης της ποσότητας των παραγόμενων από τον μύκητα αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων. Οι συνθήκες διεξαγωγής της υδρόλυσης ήταν ίδιες με εκείνες της περίπτωσης που τα στερεά της ζύμωσης αφαιρούνταν από το εναιώρημα πριν την έναρξη της υδρόλυσης (60°C, pH 4,5).

Στα διαγράμματα που ακολουθούν (Διάγραμμα 3.9 & Διάγραμμα 3.10) απεικονίζονται οι κινητικές των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του χρησιμοποιούμενου στην παρούσα μελέτη αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, χωρίς προηγουμένως να διενεργηθεί απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων της ζύμωσης στερεής κατάστασης που είχε προηγηθεί.



Διάγραμμα 3.9. Κινητική της συγκέντρωσης γλυκόζης κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης



Διάγραμμα 3.10. Κινητική της συγκέντρωσης FAN κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης

Από τα διαγράμματα που παραθέτονται παραπάνω (Διάγραμμα 3.9 & Διάγραμμα 3.10) γίνεται αντιληπτό ότι οι υψηλότερες τελικές συγκεντρώσεις γλυκόζης, αλλά και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων εντοπίστηκαν όταν της υδρόλυσης του αποβλήτου είχε προηγηθεί ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* διάρκειας τριών ημερών. Επίσης, όπως και στην περίπτωση που πριν την υδρόλυση απομακρύνονταν τα στερεά της ζύμωσης, έτσι και εδώ κατά τη δειγματοληψία, η πλειοψηφία των δειγμάτων λαμβανόταν (ανεξάρτητα από την διάρκεια της ζύμωσης που είχε προηγηθεί) εντός των δύο πρώτων ωρών της υδρόλυσης, διότι σε αυτό το χρονικό διάστημα πραγματοποιούνταν η υδρόλυση του μεγαλύτερου μέρους του περιεχόμενου στο απόβλητο αμύλου σε γλυκόζη (Koutinas et al., 2001). Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις κινητικές που απεικονίζονται στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 3.9 & Διάγραμμα 3.10).

3.1.2.1 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΜΕ ENZYMA ΑΠΟ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ *Aspergillus awamori* ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΜΙΑΣ ΗΜΕΡΑΣ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Στην περίπτωση που η ζύμωση στερεής κατάστασης που προηγήθηκε της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου διήρκησε μόλις μία ημέρα κρίθηκε απαραίτητη μία επιπλέον αραίωση των ληφθέντων δειγμάτων της τάξης του 1:10. Επομένως, τα δείγματα τελικά υπέστησαν αραίωση της τάξης του 1:20, αναλογιζόμενοι και εκείνη που είχαν υποστεί με την προσθήκη του TCA κατά την δειγματοληψία.

Στον παρακάτω πίνακα (πιν.3.6) παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων δειγμάτων του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, τα οποία λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του αποβλήτου. Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε γλυκόζη (ενζυμικά) και σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (με την μέθοδο της νινυδρίνης) (βλ. κεφ. 2.1.4).

Πίνακας 3.6 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων χημικών αναλύσεων του υδρολύματος του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου κατά την διάρκεια της υδρόλυσης, έπειτα από ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας μίας ημέρας

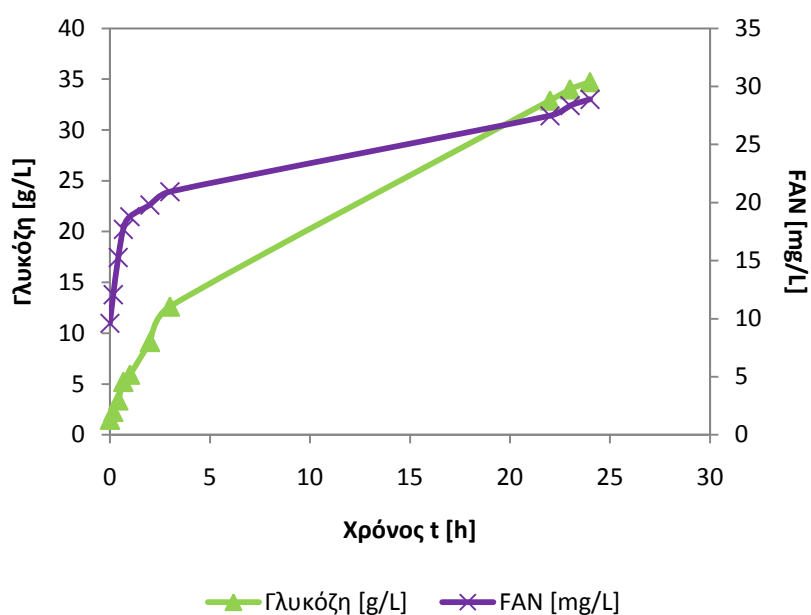
Χρόνος t [h]	Abs - 500nm	Αραιώση	Γλυκόζη [g/L]	Abs - 570nm	Αραιώση	FAN [mg/L]
0	0,0285	20	1,50	0,1135	20	9,60
0,17	0,043	20	2,27	0,1405	20	12,07
0,42	0,0645	20	3,40	0,1755	20	15,27
0,67	0,099	20	5,22	0,202	20	17,69
1	0,1125	20	5,94	0,214	20	18,78
2	0,1735	20	9,16	0,225	20	19,79
3	0,2395	20	12,64	0,2375	20	20,93
22	0,6235	20	32,90	0,309	20	27,47
23	0,6445	20	34,01	0,3185	20	28,34
24	0,658	20	34,72	0,3245	20	28,88

Abs - 500nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 500nm
 Abs - 570nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 570nm
 FAN: άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen)

Όπως είναι φανερό από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.6) όταν είχε προηγηθεί της υδρόλυσης του στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας μίας ημέρας και πριν την έναρξη της υδρόλυσης δεν είχαν απομακρυνθεί τα στερεά της ζύμωσης, η τελική συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρολυμένο απόβλητο έφτασε τα 34,72g/L. Αναλογιζόμενοι ότι η μέγιστη θεωρητική απόδοση αμύλου σε γλυκόζη κατά την υδρόλυση του συγκεκριμένου αποβλήτου είναι 93,24g/L, η απόδοση που τελικά επιτεύχθηκε κατόπιν ζύμωσης στερεής κατάστασης μίας ημέρας ήταν μόλις 37%. Η χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρολυθέν απόβλητο μετά το πέρας της υδρόλυσης δικαιολογείται από το γεγονός ότι ο μικροοργανισμός (*Aspergillus awamori*) δεν είχε προλάβει να παράξει ικανή ποσότητα αμυλολυτικών ενζύμων, όταν η ζύμωση στερεής κατάστασης στην οποία υποβλήθηκε διήρκησε μόλις μία ημέρα. Έτσι δεν κατέστη δυνατή η υδρόλυση ολόκληρης της ποσότητας του περιεχόμενου στο απόβλητο αμύλου. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων του μικροοργανισμού,

γεγονός που συμπεραίνεται από την μικρή τελική συγκέντρωση FAN (28,88mg/L) στο υδρολυμένο απόβλητο. Επίσης, με βάση τους ορισμούς των μονάδων ενεργότητας γλυκοαμυλάσης και πρωτεάσης (βλ. κεφ. 2.1.4.3) η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης στην συγκεκριμένη περίπτωση υπολογίστηκε σε μόλις 0,08U, ενώ η ενεργότητα της πρωτεάσης σε 0,25U.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 3.11) απεικονίζονται οι κινητικές των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του χρησιμοποιούμενου στην παρούσα μελέτη αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων της ζύμωσης στερεής κατάστασης που είχε προηγηθεί, όταν η διάρκεια της ζύμωσης αυτής ήταν μία ημέρα.



Διάγραμμα 3.11. Κινητική της συγκέντρωσης γλυκόζης και FAN κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου, χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης, όταν η ζύμωση αυτή είχε διαρκέσει μία ημέρα.

3.1.2.2 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ *Aspergillus awamori* ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΔΥΟ ΗΜΕΡΩΝ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Στην περίπτωση που η ζύμωση στερεής κατάστασης που προηγήθηκε της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου διήρκησε δύο ημέρες κρίθηκε απαραίτητο μέρος των δειγμάτων που λήφθηκαν κατά την διάρκεια της υδρόλυσης να αραιωθούν κατά 20 φορές, ενώ άλλα κατά 40 φορές.

Πίνακας 3.7 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων χημικών αναλύσεων του υδρόλυματος του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου κατά την διάρκεια της υδρόλυσης, έπειτα από ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας δύο ημερών

Χρόνος t [h]	Abs - 500nm	Αραίωση	Γλυκόζη [g/L]	Abs - 570nm	Αραίωση	FAN [mg/L]
0	0,0245	40	2,59	0,1775	40	30,90
0,17	0,1555	20	8,21	0,211	40	37,02
0,33	0,2175	20	11,48	0,267	40	47,26
0,5	0,282	20	14,88	0,319	40	56,76
0,67	0,445	20	23,48	0,358	40	63,89
0,83	0,5615	20	29,63	0,3825	40	68,37
1	0,613	20	32,35	0,4	40	71,57
1,08	0,3095	40	32,66	0,4005	40	71,66
1,5	0,7855	20	41,45	0,446	40	79,98
2	0,4185	40	44,17	0,483	40	86,75
2,5	0,889	20	46,91	0,5275	40	94,88
3	0,928	20	48,97	0,556	40	100,09
3,08	0,465	40	49,08	0,558	40	100,46
4	0,489	40	51,61	0,587	40	105,76
5	0,508	40	53,61	0,621	40	111,97
5,75	0,522	40	55,09	0,654	40	118,01
17,83	0,581	40	61,32	0,838	40	151,65
19	0,5875	40	62,01	0,8625	40	156,12
20,5	0,5945	40	62,74	0,895	40	162,07
24	0,6155	40	64,96	0,9345	40	169,29
26	0,626	40	66,07	0,9575	40	173,49

Abs - 500nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 500nm

Abs - 570nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 570nm

FAN: άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen)

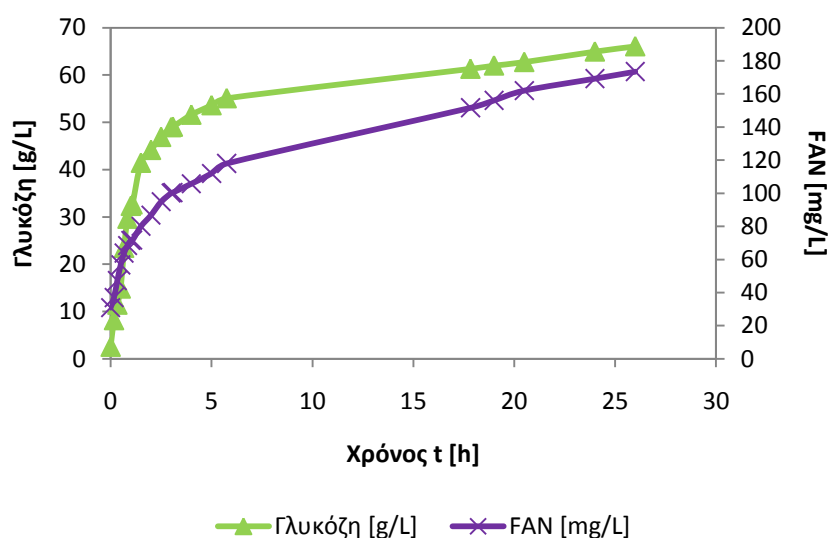
Στον παραπάνω πίνακα (πιν.3.7) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων δειγμάτων του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, τα οποία λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του αποβλήτου. Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητα τους σε γλυκόζη (ενζυμικά) και σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (με την μέθοδο της νινυδρίνης) (βλ. κεφ. 2.1.4).

Όπως γίνεται αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.7) όταν είχε προηγηθεί της υδρόλυσης του στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας δύο ημερών χωρίς να διενεργηθεί απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης πριν την έναρξη της υδρόλυσης, η τελική συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρολυμένο απόβλητο έφτασε τα 66,07g/L. Αναλογιζόμενοι ότι η μέγιστη θεωρητική απόδοση αμύλου σε γλυκόζη κατά την υδρόλυση του συγκεκριμένου αποβλήτου είναι 93,24g/L, η απόδοση που τελικά επιτεύχθηκε κατόπιν ζύμωσης στερεής κατάστασης δύο ημερών ήταν 69%, δηλαδή πολύ υψηλότερη αυτής που επιτεύχθηκε μετά από ζύμωση μίας ημέρας (37%). Αυτό σημαίνει ότι ο μύκητας *Aspergillus awamori* παρήγαγε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα αμυλολυτικών ενζύμων όταν η ζύμωση στερεής κατάστασης στην οποία υποβλήθηκε διήρκησε δύο ημέρες, σε σχέση με την περίπτωση που η ζύμωση αυτή διήρκησε μόλις μία ημέρα. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων του μικροοργανισμού, γεγονός που συμπεραίνεται από το ότι η τελική συγκέντρωση FAN στο υδρολυμένο απόβλητο μετά από δύο μέρες ζύμωσης ήταν εξαπλάσια από αυτήν που μετρήθηκε μετά από μία μέρα ζύμωσης (28,88mg/L και 173,49mg/L αντίστοιχα).

Επίσης, με βάση τους ορισμούς των μονάδων ενεργότητας γλυκοαμυλάσης και πρωτεάσης (βλ. κεφ. 2.1.4.3) η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης στην συγκεκριμένη περίπτωση υπολογίστηκε σε 0,54U, ενώ η ενεργότητα της πρωτεάσης σε 0,61U, πολύ υψηλότερες από αυτές που σημειώθηκαν μετά από ζύμωση διάρκειας μιας ημέρας (0,08U και 0,25U αντίστοιχα).

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 3.12) απεικονίζονται οι κινητικές των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του χρησιμοποιούμενου στην παρούσα μελέτη αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, χωρίς προηγουμένως να απομακρυνθούν τα στερεά

υπολείμματα της ζύμωσης στερεής κατάστασης που είχε προηγηθεί, όταν η διάρκεια της ζύμωσης αυτής ήταν δύο ημέρες.



Διάγραμμα 3.12. Κινητική της συγκέντρωσης γλυκόζης και FAN κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου, χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης, όταν η ζύμωση αυτή είχε διαρκέσει δύο ημέρες.

3.1.2.3 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ *Aspergillus awamori* ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΤΡΙΩΝ ΗΜΕΡΩΝ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Όταν της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου προηγήθηκε ζύμωση στερεής κατάστασης του *Aspergillus awamori*, η οποία διήρκησε τρεις ημέρες κρίθηκε απαραίτητο τα δείγματα που λήφθηκαν κατά την διάρκεια της υδρόλυσης να αραιωθούν κατά 40 φορές.

Στον παρακάτω πίνακα (πιν.3.8) παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων δειγμάτων του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, τα οποία λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του αποβλήτου. Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε γλυκόζη (ενζυμικά) και σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (με την μέθοδο της νινυδρίνης) (βλ. κεφ. 2.1.4).

Πίνακας 3.8 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων χημικών αναλύσεων του υδρολύματος του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου κατά την διάρκεια της υδρόλυσης, έπειτα από ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας τριών ημερών

Χρόνος t [h]	Abs - 500nm	Αραίωση	Γλυκόζη [g/L]	Abs - 570nm	Αραίωση	FAN [mg/L]
0	0,024	40	2,53	0,251	40	44,33
0,17	0,085	40	8,97	0,4065	40	72,76
0,33	0,135	40	14,25	0,4115	40	73,67
0,5	0,185	40	19,53	0,6435	40	116,09
0,67	0,208	40	21,95	0,6575	40	118,65
0,83	0,2355	40	24,85	0,766	40	138,48
1	0,2675	40	28,23	0,783	40	141,59
1,5	0,329	40	34,72	0,8715	40	157,77
2	0,376	40	39,68	0,915	40	165,72
2,5	0,415	40	43,80	0,91	40	172,30
3,08	0,4505	40	47,55	0,975	40	176,69
4	0,4845	40	51,13	1,045	40	189,49
5	0,5025	40	53,03	1,095	40	198,63
6	0,5145	40	54,30	1,146	40	207,95
18,25	0,618	40	65,22	1,447	40	262,98
19,45	0,634	40	66,91	1,481	40	269,20
21	0,646	40	68,18	1,5033	40	273,27
24,33	0,661	40	69,76	1,539	40	279,80
26	0,6715	40	70,87	1,55	40,00	281,44

Abs - 500nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 500nm

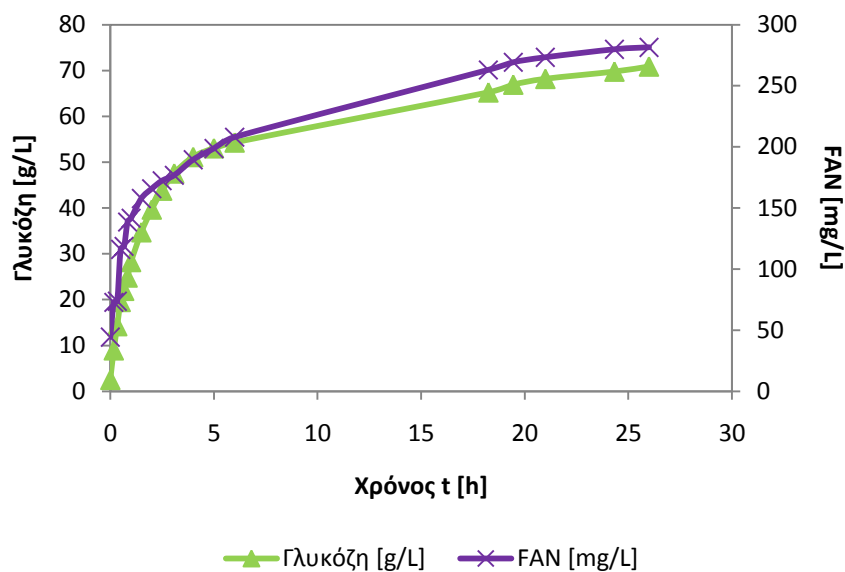
Abs - 570nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 570nm

FAN: άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen)

Όπως γίνεται αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.8) όταν είχε προηγηθεί της υδρόλυσης του στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας τριών ημερών χωρίς προηγουμένως να είχαν απομακρυνθεί τα στερεά της ζύμωσης, η τελική συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρολυμένο απόβλητο ανήλθε στα 70,87g/L. Αναλογιζόμενοι ότι η μέγιστη θεωρητική απόδοση αμύλου σε γλυκόζη κατά την υδρόλυση του συγκεκριμένου αποβλήτου είναι 93,24g/L, η απόδοση που τελικά επιτεύχθηκε κατόπιν ζύμωσης στερεής κατάστασης τριών ημερών ήταν 76%, δηλαδή μεγαλύτερη τόσο αυτής που επιτεύχθηκε μετά από ζύμωση μίας ημέρας (37%), όσο και αυτής που επιτεύχθηκε κατόπιν ζύμωσης δύο ημερών (69%). Αυτό σημαίνει ότι ο μύκητας *Aspergillus awamori* παράγαγε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα αμυλολυτικών ενζύμων όταν η ζύμωση στερεής κατάστασης στην οποία υποβλήθηκε διήρκησε τρεις ημέρες. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων του μικροοργανισμού, γεγονός που συμπεραίνεται από την πολύ μεγάλη διαφορά των τελικών συγκεντρώσεων FAN στο υδρολυμένο απόβλητο μετά από τρεις ημέρες ζύμωσης (281,44mg/L) και μετά από δύο (173,49mg/L) ή μία ημέρα ζύμωσης (μόλις 28,88mg/L). Τόσο η τελική συγκέντρωση γλυκόζης, όσο και η τελική συγκέντρωση FAN στο υδρολυμένο απόβλητο μετά από ζύμωση τριών ημερών, ήταν οι υψηλότερες που επιτεύχθηκαν σε αυτό το πείραμα στερεής ζύμωσης.

Επίσης, με βάση τους ορισμούς των μονάδων ενεργότητας γλυκοαμυλάσης και πρωτεάσης (βλ. κεφ. 2.1.4.3) η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης στην συγκεκριμένη περίπτωση υπολογίστηκε σε 0,64U, ενώ η ενεργότητα της πρωτεάσης ανήλθε σε 2,84U.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 3.13) απεικονίζονται οι κινητικές των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του χρησιμοποιούμενου στην παρούσα μελέτη αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, χωρίς προηγουμένως να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα της ζύμωσης στερεής κατάστασης που είχε προηγηθεί, όταν η διάρκεια της ζύμωσης αυτής ήταν τρεις ημέρες.



Διάγραμμα 3.13. Κινητική της συγκέντρωσης γλυκόζης και FAN κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου, χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης, όταν η ζύμωση αυτή είχε διαρκέσει τρεις ημέρες.

3.1.2.4 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟ ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ *Aspergillus awamori* ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΗΜΕΡΩΝ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΕΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Όταν της υδρόλυσης του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου προηγήθηκε ζύμωση στερεής κατάστασης του *Aspergillus awamori*, η οποία διήρκησε τέσσερις ημέρες κρίθηκε απαραίτητο τα δείγματα που λήφθηκαν κατά την διάρκεια της υδρόλυσης να αραιωθούν κατά 40 φορές.

Στον παρακάτω πίνακα (πιν.3.9) παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων δειγμάτων του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, τα οποία λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του αποβλήτου. Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε γλυκόζη (ενζυμικά) και σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (με την μέθοδο της νινυδρίνης) (βλ. κεφ. 2.1.4).

Πίνακας 3.9 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων χημικών αναλύσεων του υδρολύματος του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου κατά την διάρκεια της υδρόλυσης, έπειτα από ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας τεσσάρων ημερών

Χρόνος t [h]	Abs - 500nm	Αραιώση	Γλυκόζη [g/L]	Abs - 570nm	Αραιώση	FAN [mg/L]
0	0,023	40	2,43	0,269	40	47,62
0,17	0,127	40	13,40	0,463	40	83,09
0,33	0,2285	40	24,12	0,554	40	99,73
0,58	0,367	40	38,73	0,6725	40	121,39
1,08	0,429	40	45,28	0,743	40	134,28
1,58	0,4625	40	48,81	0,79	40	142,87
2,08	0,489	40	51,61	0,8395	40	151,92
2,58	0,5025	40	53,03	0,865	40	156,58
20,42	0,6425	40	67,81	1,139	40	206,67
22,08	0,658	40	69,45	1,1595	40	210,42
23,58	0,665	40	70,18	1,18	40	214,17

Abs - 500nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 500nm

Abs - 570nm: Απορρόφηση του δείγματος στα 570nm

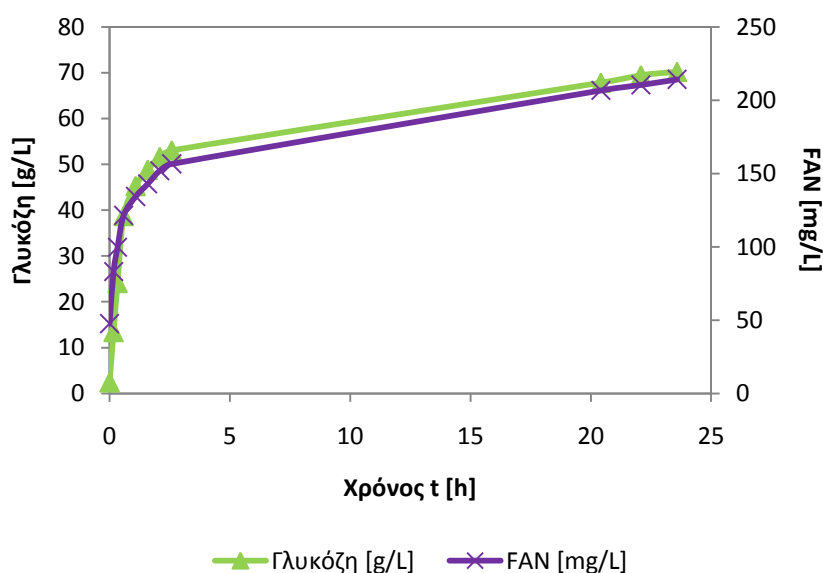
FAN: άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen)

Από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.9) είναι φανερό ότι όταν είχε προηγηθεί της υδρόλυσης του στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας τεσσάρων ημερών, χωρίς να είχαν απομακρυνθεί τα στερεά της ζύμωσης πριν την έναρξη της υδρόλυσης, η τελική συγκέντρωση γλυκόζης στο υδρολυμένο απόβλητο έφτασε τα 70,18g/L. Αναλογιζόμενοι ότι η μέγιστη θεωρητική απόδοση αμύλου σε γλυκόζη κατά την υδρόλυση του συγκεκριμένου αποβλήτου είναι 93,24g/L, η απόδοση που τελικά επιτεύχθηκε κατόπιν ζύμωσης στερεής κατάστασης τεσσάρων ημερών ήταν 75%. Επίσης, η τελική συγκέντρωση FAN έφτασε τα 214,17mg/L. Τόσο η τελική συγκέντρωση της γλυκόζης, όσο και του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) στο υδρολυμένο απόβλητο, ήταν χαμηλότερη από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις όταν τα ένζυμα είχαν προέλθει από ζύμωση τριών

ημερών. Από το γεγονός αυτό γίνεται αντιληπτό ότι στην περίπτωση που ο μύκητας *Aspergillus awamori* υποβλήθηκε σε ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας τεσσάρων ημερών η δράση τόσο των αμυλολυτικών αλλά κυρίως των πρωτεολυτικών του ενζύμων μειώθηκε.

Επίσης, με βάση τους ορισμούς των μονάδων ενεργότητας γλυκοαμυλάσης και πρωτεάσης (βλ. κεφ. 2.1.4.3) η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης στην συγκεκριμένη περίπτωση υπολογίστηκε σε 1,10U και της πρωτεάσης σε 3,55U. Τόσο η προαναφερθείσα ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης, όσο και της πρωτεάσης ήταν οι υψηλότερες που επιτεύχθηκαν σε αυτό το πείραμα στερεής ζύμωσης.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 3.14) απεικονίζονται οι κινητικές των συγκεντρώσεων γλυκόζης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του χρησιμοποιούμενου στην παρούσα μελέτη αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, χωρίς προηγουμένως να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα της ζύμωσης στερεής κατάστασης που είχε προηγηθεί, όταν η διάρκεια της ζύμωσης αυτής ήταν τέσσερις ημέρες.



Διάγραμμα 3.14. Κινητική της συγκέντρωσης γλυκόζης και FAN κατά τη διάρκεια υδρόλυσης του αποβλήτου, χωρίς προηγούμενη απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης, όταν η ζύμωση αυτή είχε διαρκέσει τέσσερις ημέρες.

3.2 ΖΥΜΩΣΗ ΥΓΡΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Mortierella isabellina* ΣΕ ΥΔΡΟΛΥΜΑ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ

Μετά την υδρόλυση του αμυλοπρωτεϊνούχου στερεού αποβλήτου, με τη βοήθεια των ενζύμων που παρήχθησαν από τον μύκητα *Aspergillus awamori* όταν αυτός υποβλήθηκε σε ζύμωση στερεής κατάστασης, πραγματοποιήθηκε ζύμωση υγρής κατάστασης του ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* με χρήση του υδρολυμένου αποβλήτου ως θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (βλ.κεφ.2.2.2). Η ζύμωση υγρής κατάστασης που πραγματοποιήθηκε ήταν ασυνεχής (batch) ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180grm) και θερμοκρασία 28°C υπό αερόβιες συνθήκες. Σκοπός ήταν η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους από τον μύκητα *Mortierella isabellina* και γενικότερα η διερεύνηση της βιοχημικής και φυσιολογικής συμπεριφοράς του μικροοργανισμού (μικροβιακή αύξηση, παραγωγή κυτταρικής βιομάζας, κατανάλωση του υποστρώματος, παραγωγή μικροβιακού λίπους και προσδιορισμός των λιπαρών του οξέων). Σύμφωνα με προγενέστερες μελέτες έχει αποδειχτεί ότι ο μύκητας *Mortierella isabellina* εμφανίζει δυναμική συσσώρευσης μικροβιακού λίπους υψηλής διατροφικής και οικονομικής αξίας (Papanikolaou et al., 2004, Fakas et al., 2006, Papanikolaou et al., 2007, Fakas et al., 2009).

Στα πλαίσια των πειραμάτων υγρής ζύμωσης της παρούσας μελέτης, ως πηγή άνθρακα και αζώτου χρησιμοποιήθηκε το υδρολυμένο αμυλοπρωτεϊνούχο απόβλητο, του οποίου τόσο η συγκέντρωση γλυκόζης, όσο και η συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) ποίκιλε, αναλόγως με την συγκέντρωση του υδρολυθέντος αποβλήτου (100g/L ή 150g/L), καθώς και την διάρκεια της ζύμωσης στερεής κατάστασης από την οποία προέρχονταν τα ένζυμα της υδρόλυσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι συνολικά πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα ζύμωσης υγρής κατάστασης, εκ των οποίων στα δύο χρησιμοποιήθηκαν ως θρεπτικό υπόστρωμα μίγματα υδρολυμάτων του αποβλήτου. Στον πίνακα που ακολουθεί (πιν.3.10) παρουσιάζεται η σύσταση και τα στοιχεία προέλευσης του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε σε καθένα από τα προαναφερθέντα πειράματα.

Πίνακας 3.10 Σύσταση και στοιχεία προέλευσης του θρεπτικού μέσου των ζυμώσεων υγρής κατάστασης του μύκητα *Mortierella isabellina*

	$C_{\text{αποβλήτου}}$ [g/L]	Διάρκεια υδρόλυσης [h]	Αρχική $C_{\text{αναγ.σακχάρων}}$ [g/L]	Αρχική C_{Glc} [g/L]	Αρχική C_{FAN} [mg/L]
Πείραμα 1ο	100	24	80,55	68,39	202,93
Πείραμα 2ο	100	24	91,40	71,00	270,11
Πείραμα 3ο	100	48	92,41	90,00	313,89
Πείραμα 4ο	150	48	138,24	129,82	404,57

$C_{\text{αποβλήτου}}$: η συγκέντρωση του υδρολυθέντος αποβλήτου

Αρχική $C_{\text{αναγ.σακχάρων}}$: η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης πριν την έναρξη αυτής

Αρχική C_{Glc} : η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης πριν την έναρξη αυτής

Αρχική C_{FAN} : η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης πριν την έναρξη αυτής

Σε όλα τα πειράματα παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) στο θρεπτικό μέσο υφίσταντο μείωση της τάξης του 63-80% εντός των δύο πρώτων ημερών (46 ± 4 h) της ζύμωσης. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η αρχική συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) στο υπόστρωμα της καλλιέργειας, τόσο μικρότερη ήταν η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους από τον μικροοργανισμό (δηλ. μικρότερος συντελεστής απόδοσης λίπους Y_{LX}). Αυτό σημαίνει πως το άζωτο αποτέλεσε περιοριστικό παράγοντα της λιποσυσσώρευσης. Επιπροσθέτως, πρέπει να σημειωθεί ότι σε κάθε περίπτωση μετά το πέρας της ζύμωσης υγρής κατάστασης δεν έμενε καθόλου ακατανάλωτη γλυκόζη. Όσον αφορά την τιμή του pH, κατά την διάρκεια των ζυμώσεων δεν παρουσίασε ιδιαίτερη μεταβολή ($6,0 \pm 0,2$), γεγονός που δεικνύει την απουσία οργανικών οξέων στο μέσο της καλλιέργειας και την κατεύθυνση της μεταβολικής διεργασίας προς την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, όπως και επιθυμείται.

Στον παρακάτω πίνακα (πιν.3.11) εμφανίζεται μία σύνοψη των σημείων της κινητικής για κάθε ένα από τα πειράματα ζύμωσης βυθού που πραγματοποιήθηκαν, στα οποία ο μύκητας *Mortierella isabellina* εμφάνισε την μεγαλύτερη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους. Από τον πίνακα 3.11 διαπιστώνεται πως ο εν λόγω μύκητας παρουσίασε αρκετά υψηλή κυτταρική ανάπτυξη (16,8-45,7g/L) και αξιοσημείωτη συσσώρευση λίπους (9,2-19,4g/L) και στα τέσσερα πειράματα. Ωστόσο, η περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπους σε γ-λινολενικό οξύ (GLA) ήταν σχετικά χαμηλή (< 4,32%) σε όλα τα πραγματοποιηθέντα πειράματα.

Πίνακας 3.11 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας του μύκητα *Mortierella isabellina* σε υδρολυμένο αμυλοπρωτεϊνούχο απόβλητο

	Χρόνος t [h]	Βιομάζα X [g/L]	L_{max} [g/L]	Y_{L/X} [g/g]	Βιομάζα άνευ λίπους [g/L]
Πείραμα 1ο	163,5	19,6	13,1	0,67	6,5
Πείραμα 2ο	144,5	16,8	9,2	0,55	7,6
Πείραμα 3ο	187,5	31,4	12,7	0,40	18,7
Πείραμα 4ο	280	45,7	19,4	0,42	26,3

L_{max}: Το μέγιστο παραγόμενο μικροβιακό λίπος
Y_{L/X}: Συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας

3.2.1 ΠΡΩΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Mortierella isabellina* ΣΕ ΥΔΡΟΛΥΜΑ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ

Σε αυτό το πείραμα το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας του ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* προήλθε από μείξη υδρολυμάτων (από υδρόλυση 24h) του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου. Συγκεκριμένα αναμείχθηκαν υδρολύματα τα ένζυμα των οποίων είχαν προέλθει από ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* δύο και τριών ημερών με συμμετοχή των στερεών της ζύμωσης στην διαδικασία της υδρόλυσης και δύο ημερών με αφαίρεση των στερεών της ζύμωσης πριν την έναρξη της υδρόλυσης. Το μίγμα των παραπάνω υδρολυμάτων, πριν χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό υπόστρωμα της ζύμωσης βυθού του *Mortierella isabellina*, υφίστατο αποστείρωση αρχικά με φίλτρο και κατόπιν σε αυτόκλειστο (121°C / 1,5 atm, για 20min) (βλ.κεφ.2.2.2). Κατά την αποστείρωση με φίλτρο κάποιες μεγαλομοριακές ενώσεις (κυρίως πρωτεΐνες) συγκρατούνται και δεν περνούν στο αποστειρωμένο υδρόλυμα. Η αποστείρωση σε αυτόκλειστο πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια για να διαπιστωθούν μακροσκοπικά (με αλλαγή του χρώματος του υδρολύματος) πιθανές μεταβολές (π.χ καστάνωση, μετουσίωση πρωτεϊνών, καραμελοποίηση σακχάρων) στο ήδη αποστειρωμένο (με φίλτρο) υδρόλυμα, υπό τις συνθήκες που επικρατούν στο αυτόκλειστο (121°C / 1,5 atm). Τελικά δεν διαπιστώθηκε καμία μακροσκοπική μεταβολή στο δις αποστειρωμένο μίγμα υδρολυμάτων. Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος μετά την αποστείρωση ήταν 202,93mg/L άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και 80,55g/L ανάγοντα σάκχαρα, εκ των οποίων 68,39g/L ήταν γλυκόζη.

Η ανάπτυξη του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα με την παραπάνω σύσταση ήταν πλήρως ικανοποιητική, ομοίως και η λιποσυσσώρευση που επιτεύχθηκε. Συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας, ήταν 19,60g/L, με μέγιστη συσσώρευση λίπους 13,07g/L, δηλαδή η απόδοση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα ανήλθε σε 66,7%. Ωστόσο, η περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπους σε γ-λινολενικό οξύ δεν ξεπέρασε το 2,2%.

Στον πίνακα που ακολουθεί (πιν.3.12) παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων του υπερκειμένου της καλλιέργειας, καθώς και η βιομάζα και το ενδοκυτταρικό λίπος που παρήγαγε ο μικροοργανισμός κατά την διάρκεια αυτού του πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης. Επίσης, παρουσιάζεται

και η περιεκτικότητα του ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα σε γ-λινολενικό οξύ ($\Delta^{6,9,12}\text{C18:3}$, ω -6).

Πίνακας 3.12 Αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων του υπερκειμένου της καλλιέργειας του μύκητα *Mortierella isabellina* και προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας, μικροβιακού λίπους και γ-λινολενικού οξέος

t [h]	A 540 nm	Αραιώση	Καναγ. σακχάρων [g/L]	A 500 nm	Αραιώση	C _{Glc} [g/L]	A 570nm	Αραιώση	C _{FAN} [mg/L]	X [g/L]	L [g/L]	Y _{LX} [g/g]	GLA (%)
0	2,2095	20	80,55	1,296	20	68,39	1,1185	20	202,93	0	0	0	0
46,5	0,911	40	66,67	0,6855	20	36,17	0,229	20	40,31	9,66	3,34	0,35	2,01
140,5	0,1695	40	12,74	0,028	20	1,48	0,1805	20	31,44	17,59	11,34	0,65	2,16
163,5	0,065	40	5,14	0,001	20	0,05	0,1475	20	25,41	19,60	13,07	0,67	2,20

t: η διάρκεια της ζύμωσης υγρής κατάστασης του *Mortierella isabellina* σε αυτό το πείραμα

A-540 nm, A-500 nm, A-570 nm: η απορρόφηση των δειγμάτων του υπερκειμένου της καλλιέργειας στα 540nm, 500nm, 570nm αντίστοιχα

Καναγ.σακχάρων: η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

C_{Glc}: η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

C_{FAN}: η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

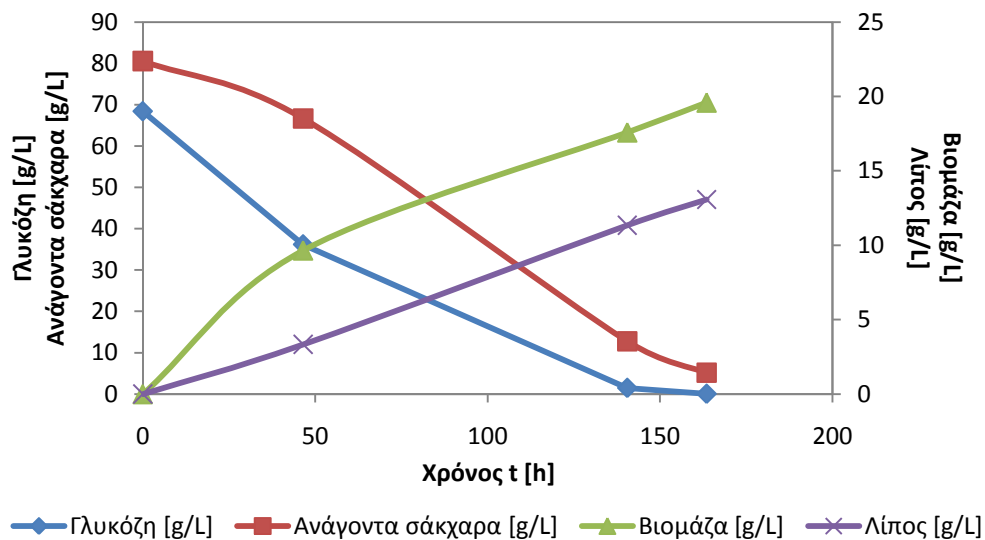
X: η παραγόμενη από τον μύκητα βιομάζα

L: το παραγόμενο από τον μύκητα μικροβιακό λίπος

Y_{LX}: συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας

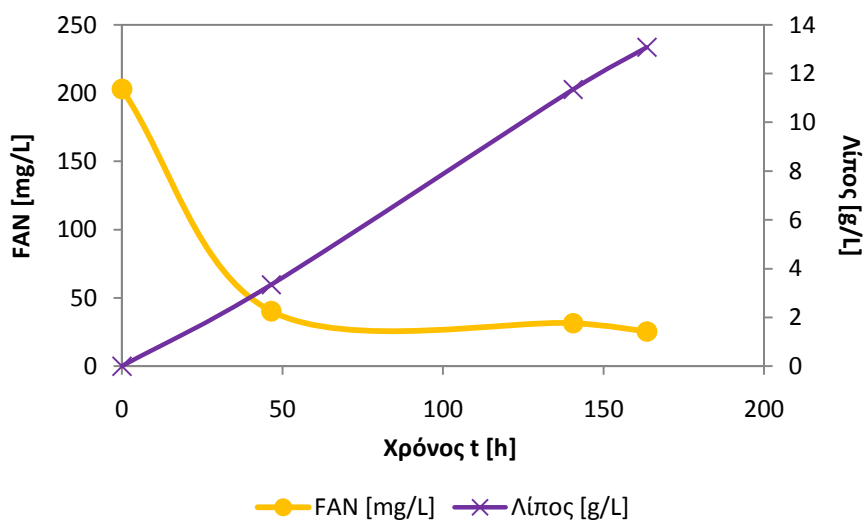
GLA (%): η επί % περιεκτικότητα του παραγόμενου από τον μύκητα ενδοκυτταρικού λίπους σε γ-λινολενικό οξύ ($\Delta^{6,9,12}\text{C18:3}$, ω -6)

Η κινητική αύξησης, παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους και κατανάλωσης των αναγόντων σακχάρων και της γλυκόζης για τον *Mortierella isabellina* στο εν λόγω υπόστρωμα παρουσιάζεται σχηματικά στο παρακάτω γράφημα (Διάγραμμα 3.15), όπου, όπως φαίνεται, η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκίνησε λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό, χωρίς να παρατηρείται ιδιαίτερη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης. Επίσης, η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα και το μέγιστο παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος εντοπίστηκαν 163,5h μετά τον εμβολιασμό. Η εξάντληση της περιεχόμενης στο θρεπτικό μέσο γλυκόζης σηματοδότησε το τέλος της ζύμωσης.



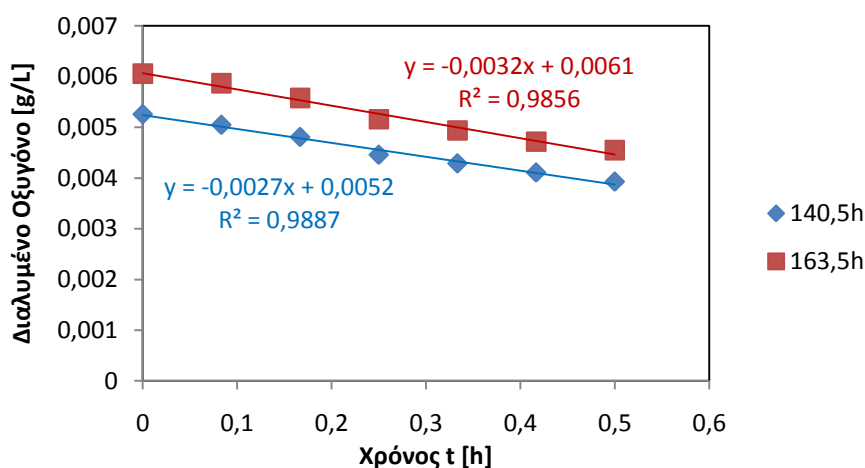
Διάγραμμα 3.15. Κινητική εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της κατανάλωσης αναγόντων σακχάρων και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα του 1^{ου} πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης

Όπως ήταν αναμενόμενο, η συσσώρευση μικροβιακού λίπους εντάθηκε αφότου είχε εξαντληθεί το μεγαλύτερο μέρος του αζώτου, πράγμα που διαπιστώνεται εύκολα στο γράφημα που ακολουθεί (Διάγραμμα 3.16). Η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) μειώθηκε πάνω από 80% εντός των πρώτων 46 ωρών της ζύμωσης.



Διάγραμμα 3.16. Κινητική εξέλιξης του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και του ενδοκυτταρικού λίπους κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα του 1^{ου} πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης

Επίσης, κατά τη διάρκεια του αυξητικού κύκλου του μύκητα *Mortierella isabellina* στο εν λόγω υπόστρωμα, μετρήθηκε το ποσοστό του διαλυμένου οξυγόνου στο περιβάλλον της ζύμωσης. Έτσι, μετά από 140,5 ώρες ζύμωσης το διαλυμένο οξυγόνο βρέθηκε 67,1%, ενώ μετά από 163,5 ώρες (στο τέλος της ζύμωσης) το διαλυμένο οξυγόνο ήταν αυξημένο (77,6%). Η αύξηση αυτή προς το τέλος της ζύμωσης δικαιολογείται από το γεγονός ότι στην αρχή οι ανάγκες του μικροοργανισμού σε οξυγόνο είναι μεγαλύτερες, λόγω του καταβολισμού της πηγής άνθρακα και της συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους. Επιπλέον, μετρήθηκε ο ρυθμός κατανάλωσης του οξυγόνου σε αυτές τις δύο χρονικές στιγμές, ο οποίος βρέθηκε ίσος με $0,0027\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ στις 140,5 ώρες μετά τον εμβολιασμό και $0,0032\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ στις 163,5 ώρες ζύμωσης, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 3.17).



Διάγραμμα 3.17. Κινητική της κατανάλωσης του διαλυμένου στην καλλιέργεια οξυγόνου στις 140,5h και στις 163,5h μετά την έναρξη της ζύμωσης υγρής κατάστασης του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα του 1^{ου} πειράματος

Ακολούθησε ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού λίπους στον αέριο χρωματογράφο. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παραθέτονται στον ακόλουθο πίνακα (πιν.3.13).

Πίνακας 3.13 Σύσταση του ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα *Mortierella isabellina* κατά την καλλιέργειά του στο θρεπτικό υπόστρωμα του 1^{ου} πειράματος

Χρόνος [h]	C14:0	C16:0	^{Δ9} C16:1	C18:0	^{Δ9} C18:1	^{Δ9,12} C18:2	^{Δ6,9,12} C18:3
46,5	0,72	22,59	1,85	4,47	59,26	9,10	2,01
140,5	0,87	19,48	2,02	2,48	57,93	15,06	2,16
163,5	0,76	19,63	2,04	2,71	58,28	14,36	2,20

Από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.13) είναι εμφανές ότι το επικρατέστερο λιπαρό οξύ στο μικροβιακό λίπος του μύκητα *Mortierella isabellina* είναι το ελαϊκό οξύ (^{Δ9}C18:1), το οποίο μάλιστα αποτελεί σχεδόν το 60% του συνολικού ενδοκυτταρικού λίπους. Αντιθέτως, η περιεκτικότητα σε γ-λινολενικό οξύ (^{Δ6,9,12}C18:3) είναι σχετικά χαμηλή, παρουσιάζοντας μία πολύ μικρή αύξηση (0,2%) έως το τέλος της ζύμωσης.

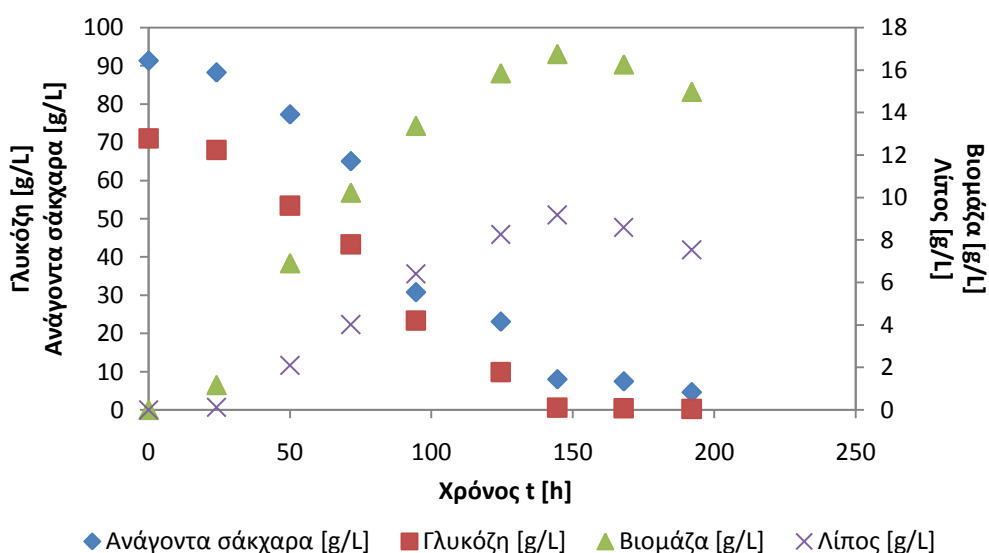
3.2.2 ΔΕΥΤΕΡΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Mortierella isabellina* ΣΕ ΥΔΡΟΛΥΜΑ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ

Στο δεύτερο πείραμα ζύμωσης υγρής κατάστασης το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας του μύκητα *Mortierella isabellina* προήλθε από μείξη υδρολυμάτων (από υδρόλυση 24h) του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου. Συγκεκριμένα αναμείχθηκαν υδρολύματα τα ένζυμα των οποίων είχαν προέλθει από ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* δύο, τριών και τεσσάρων ημερών με συμμετοχή των στερεών της ζύμωσης στην διαδικασία της υδρόλυσης και δύο ημερών με αφαίρεση των στερεών της ζύμωσης πριν την έναρξη της υδρόλυσης. Το μίγμα των παραπάνω υδρολυμάτων, πριν χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό υπόστρωμα της ζύμωσης βυθού του *Mortierella isabellina*, υφίστατο αποστείρωση σε αυτόκλειστο (121°C / 1,5 atm, για 20min) (βλ.κεφ.2.2.2). Μετά την αποστείρωση παρατηρήθηκε ότι η απόχρωση του θρεπτικού μέσου ήταν ελαφρώς πιο σκούρα από ότι πριν, διατηρώντας όμως την διαύγειά του. Αυτό σημαίνει ότι λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που επικρατούσε στο αυτόκλειστο πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις καστώνωσης (Maillard) στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η σύσταση του θρεπτικού

υποστρώματος μετά την αποστείρωση ήταν 270,11mg/L άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και 91,40g/L ανάγοντα σάκχαρα, εκ των οποίων 71,00g/L ήταν γλυκόζη.

Η ανάπτυξη του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα με την παραπάνω σύσταση ήταν ικανοποιητική, ομοίως και η λιποσυσσώρευση που επιτεύχθηκε. Συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας, ήταν 16,77g/L, με μέγιστη συσσώρευση λίπους 9,18g/L, δηλαδή η απόδοση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα ανήλθε σε 54,8%. Ωστόσο, η περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπους σε γ-λινολενικό οξύ δεν ξεπέρασε το 3,12%, δηλαδή ήταν λίγο υψηλότερη από αυτήν του 1^{ου} πειράματος (2,20%).

Πρέπει να σημειωθεί ότι περίπου 145h μετά τον εμβολιασμό παρατηρήθηκε εξάντληση της γλυκόζης από το θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας. Έτσι, ο μικροοργανισμός προέβη σε κατανάλωση του ενδοκυτταρικού του λίπους προκειμένου να ικανοποιήσει τις ανάγκες του σε άνθρακα. Συνεπώς, από τις 145h και έπειτα, παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού λίπους και ως εκ τούτου και της βιομάζας του μύκητα, αλλά η συγκέντρωση της βιομάζας άνευ λίπους παρέμεινε σταθερή. Τα παραπάνω παρουσιάζονται γραφικά στο διάγραμμα 3.18, που ακολουθεί.



Διάγραμμα 3.18. Κινητική εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της κατανάλωσης αναγόντων σακχάρων και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα του 2^{ου} πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης

Στον πίνακα που ακολουθεί (πιν.3.14) παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων του υπερκειμένου της καλλιέργειας, καθώς και η βιομάζα και το ενδοκυτταρικό λίπος που παρήγαγε ο μικροοργανισμός κατά την διάρκεια αυτού του πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης. Επίσης, παρουσιάζεται και η περιεκτικότητα του ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα σε γ -λινολενικό οξύ ($\Delta^{6,9,12}$ C18:3, ω -6).

Πίνακας 3.14 Αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων του υπερκειμένου της καλλιέργειας του μύκητα *Mortierella isabellina* και προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας, μικροβιακού λίπους και γ -λινολενικού οξέος

t [h]	A 540 nm	Αραι- ωση	C _{αναγ.} σακχάρων [g/L]	A 500 nm	Αραι- ωση	C _{Glc} [g/L]	A 570nm	Αραι- ωση	C _{FAN} [mg/L]	X [g/L]	L [g/L]	Y _{L/X} [g/g]	GLA (%)
0	1,251	40	91,40	1,3455	20	71,00	1,486	20	270,11	0	0	0	0
24	1,2085	40	88,31	1,289	20	68,02	1,004	20	181,99	1,17	0,12	0,10	
50	1,0575	40	77,32	1,0125	20	53,43	0,3005	20	53,38	6,91	2,09	0,30	3,12
71,5	0,889	40	65,07	0,82	20	43,27	0,28	20	49,63	10,24	4,02	0,39	
94,5	0,4175	40	30,78	0,443	20	23,38	0,235	20	41,41	13,38	6,41	0,48	1,71
124,5	0,3115	40	23,07	0,187	20	9,87	0,1965	20	34,37	15,86	8,26	0,52	
144,5	0,104	40	7,98	0,0105	20	0,55	0,1725	20	29,98	16,77	9,18	0,55	1,17
168	0,0965	40	7,43	0,008	20	0,42	0,1295	20	22,12	16,28	8,60	0,53	
192	0,0575	40	4,60	0,005	20	0,26	0,1255	20	21,39	14,99	7,54	0,50	0,88

t: η διάρκεια της ζύμωσης υγρής κατάστασης του *Mortierella isabellina* σε αυτό το πείραμα

A-540 nm, A-500 nm, A-570 nm: η απορρόφηση των δειγμάτων του υπερκειμένου της καλλιέργειας στα 540nm, 500nm, 570nm αντίστοιχα

C_{αναγ.σακχάρων}: η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

C_{Glc}: η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

C_{FAN}: η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

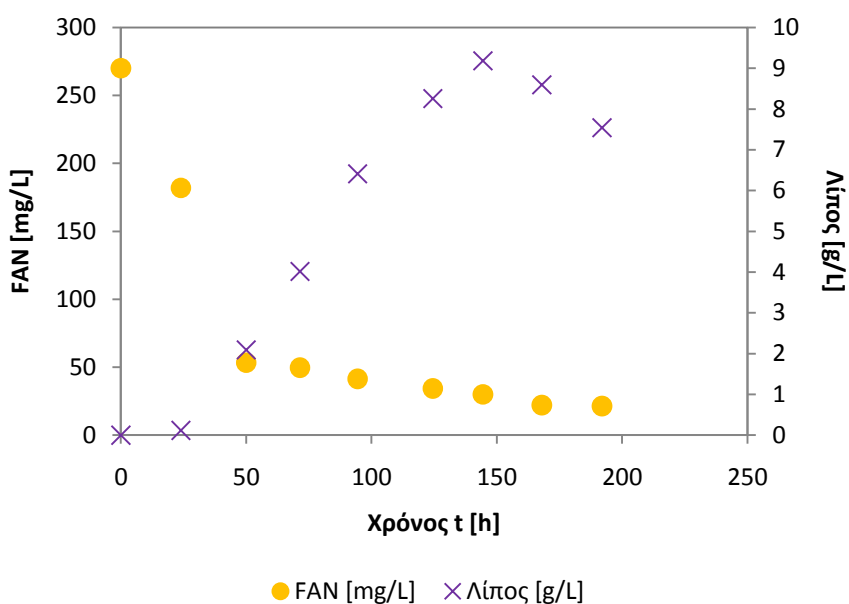
X: η παραγόμενη από τον μύκητα βιομάζα

L: το παραγόμενο από τον μύκητα μικροβιακό λίπος

Y_{L/X}: συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας

GLA (%): η επί % περιεκτικότητα του παραγόμενου από τον μύκητα ενδοκυτταρικού λίπους σε γ -λινολενικό οξύ ($\Delta^{6,9,12}$ C18:3, ω -6)

Αξιοσημείωτο είναι, επίσης, το γεγονός ότι ενώ η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπόστρωμα αυτού του πειράματος δεν διέφερε ιδιαίτερα από εκείνη του υποστρώματος του 1^{ου} πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης (68,39g/L στο 1^ο πείραμα, 71,00g/L στο 2^ο πείραμα), ωστόσο η μέγιστη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους ήταν αρκετά χαμηλότερη (13,07g/L στο 1^ο πείραμα, 9,18g/L στο 2^ο πείραμα). Αυτό συνέβη, διότι στο 2^ο πείραμα ζύμωσης βυθού η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) ήταν αρκετά υψηλότερη (202,93mg/L στο 1^ο πείραμα, 270,11mg/L στο 2^ο πείραμα), με αποτέλεσμα να περιοριστεί περισσότερο η λιποσυσσώρευση του *Mortierella isabellina*, ιδιαίτερα στην αρχή της ζύμωσης, μέχρις ότου καταναλωθεί το 70% περίπου του FAN (πρώτες 50h). Όσα προαναφέρθηκαν γίνονται αντιληπτά από το παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 3.19).



Διάγραμμα 3.19. Κινητική εξέλιξη του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και του ενδοκυτταρικού λίπους κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα του 2^{ου} πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης

Κατά τη διάρκεια του αυξητικού κύκλου του μύκητα *Mortierella isabellina* στο εν λόγω υπόστρωμα η μέτρηση του ποσοστού του διαλυμένου οξυγόνου στο περιβάλλον της ζύμωσης, δεν ήταν δυνατή λόγω την υψηλής πυκνότητας της καλλιέργειας σε βιομάζα, η οποία μάλιστα είχε ελαφρώς νηματώδη μορφή.

Ακολούθησε ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού λίπους στον αέριο χρωματογράφο. Λήφθηκαν δείγματα προς ανάλυση για κάθε μία από τις εξής φάσεις του αυξητικού κύκλου του μύκητα: αρχική εκθετική φάση (50h), μέση εκθετική φάση (94,5h), τελική εκθετική φάση (144,5h) και φάση αυτόλυσης (192h) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παραθέτονται στον ακόλουθο πίνακα (πιν.3.15).

Πίνακας 3.15 Σύσταση του ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα *Mortierella isabellina* κατά την καλλιέργειά του στο θρεπτικό υπόστρωμα του 2^{ου} πειράματος

Χρόνος [h]	C14:0	C16:0	Δ^9 C16:1	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3
50	0,80	25,34	1,98	6,05	54,08	8,64	3,12
94,5	0,98	23,91	1,41	6,52	53,62	11,85	1,71
144,5	0,84	22,67	1,08	9,90	53,83	10,51	1,17
192	0,73	22,44	0,99	11,78	52,87	10,32	0,88

Από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.15) είναι εμφανές ότι και σε αυτό το πείραμα το επικρατέστερο λιπαρό οξύ στο μικροβιακό λίπος του μύκητα *Mortierella isabellina* είναι το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1), το οποίο μάλιστα αποτελεί πάνω από το 50% του συνολικού ενδοκυτταρικού λίπους. Η περιεκτικότητα του ενδοκυτταρικού λίπους σε γ -λινολενικό οξύ (GLA, $\Delta^{6,9,12}$ C18:3) είναι σχετικά χαμηλή (3,12%), παρουσιάζοντας συνεχή πτώση μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Συνεχή μείωση από την αρχή μέχρι το τέλος της ζύμωσης παρουσιάζει επίσης η περιεκτικότητα του λίπους σε παλμιτικό (C16:0) και παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1). Αντιθέτως, συνεχή αύξηση παρουσιάζει η περιεκτικότητα σε στεατικό οξύ (C18:0), ακόμα και κατά την φάση αυτόλυσης του μικροοργανισμού.

3.2.3 ΤΡΙΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Mortierella isabellina* ΣΕ ΥΔΡΟΛΥΜΑ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ

Στο συγκεκριμένο πείραμα ζύμωσης υγρής κατάστασης το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας του μύκητα *Mortierella isabellina* προήλθε από υδρόλυση 48 ωρών 100g/L αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου. Τα ένζυμα που πραγματοποίησαν την υδρόλυση είχαν προέλθει από ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* τριών ημερών με συμμετοχή των στερεών της ζύμωσης στην διαδικασία της υδρόλυσης. Το προαναφερθέν υδρόλυμα, πριν χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό υπόστρωμα της ζύμωσης βυθού του *Mortierella isabellina*, υφίστατο αποστείρωση με φίλτρο. Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος μετά την αποστείρωση ήταν 313,89mg/L άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και 92,41g/L ανάγοντα σάκχαρα, εκ των οποίων 90,00g/L ήταν γλυκόζη.

Η ανάπτυξη του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα με την παραπάνω σύσταση ήταν πολύ ικανοποιητική, ομοίως και η λιποσυσσώρευση που επιτεύχθηκε. Συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας, ήταν 31,38g/L, με μέγιστη συσσώρευση λίπους 12,67g/L, δηλαδή η απόδοση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα έφτασε το 40,39%. Ωστόσο, η περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπους σε γ -λινολενικό οξύ δεν ξεπέρασε το 4,32%, τιμή που αποτελούσε και την υψηλότερη σε όλα τα πειράματα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι περίπου 188h μετά τον εμβολιασμό παρατηρήθηκε εξάντληση της γλυκόζης από το θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας, η οποία σηματοδότησε και το τέλος της ζύμωσης υγρής κατάστασης του *Mortierella isabellina*.

Στον πίνακα που ακολουθεί (πιν.3.16) παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων του υπερκειμένου της καλλιέργειας, καθώς και η βιομάζα και το ενδοκυτταρικό λίπος που παρήγαγε ο μικροοργανισμός κατά την διάρκεια αυτού του πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης. Επίσης, παρουσιάζεται και η περιεκτικότητα του ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα σε γ -λινολενικό οξύ ($\Delta^{6,9,12}$ C18:3, ω -6).

Πίνακας 3.16 Αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων του υπερκειμένου της καλλιέργειας του μύκητα *Mortierella isabellina* και προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας, μικροβιακού λίπους και γ-λινολενικού οξέος

t [h]	A 540 nm	Αραι- ωση	Καναγ. σακχάρων [g/L]	A 500 nm	Αραι- ωση	C _{Glc} [g/L]	A 570nm	Αραι- ωση	C _{FAN} [mg/L]	X [g/L]	L [g/L]	Y _{LX} [g/g]	GLA (%)
0	1,265	40	92,41	1,7055	20	90,00	1,7255	20	313,89	0	0	0	0
24	0,9965	40	72,89	1,283	20	67,70	0,9195	20	166,54	6,16	0,13	0,02	4,32
46	0,7605	40	55,72	0,897	20	47,34	0,6235	20	112,43	9,23	1,58	0,17	
73	0,5515	40	40,52	0,688	20	36,31	0,1455	20	25,05	15,66	5,20	0,33	0,92
97	0,4035	40	29,76	0,466	20	24,59	0,1435	20	24,68	19,99	8,17	0,41	
120	0,093	40	7,18	0,101	20	5,33	0,1005	20	16,82	25,88	12,17	0,47	0,74
187,5	0,0065	40	0,89	0,004	20	0,21	0,0665	20	10,60	31,38	12,67	0,40	1,21

t: η διάρκεια της ζύμωσης υγρής κατάστασης του *Mortierella isabellina* σε αυτό το πείραμα

A-540 nm, A-500 nm, A-570 nm: η απορρόφηση των δειγμάτων του υπερκειμένου της καλλιέργειας στα 540nm, 500nm, 570nm αντίστοιχα

Καναγ.σακχάρων: η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

C_{Glc}: η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

C_{FAN}: η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

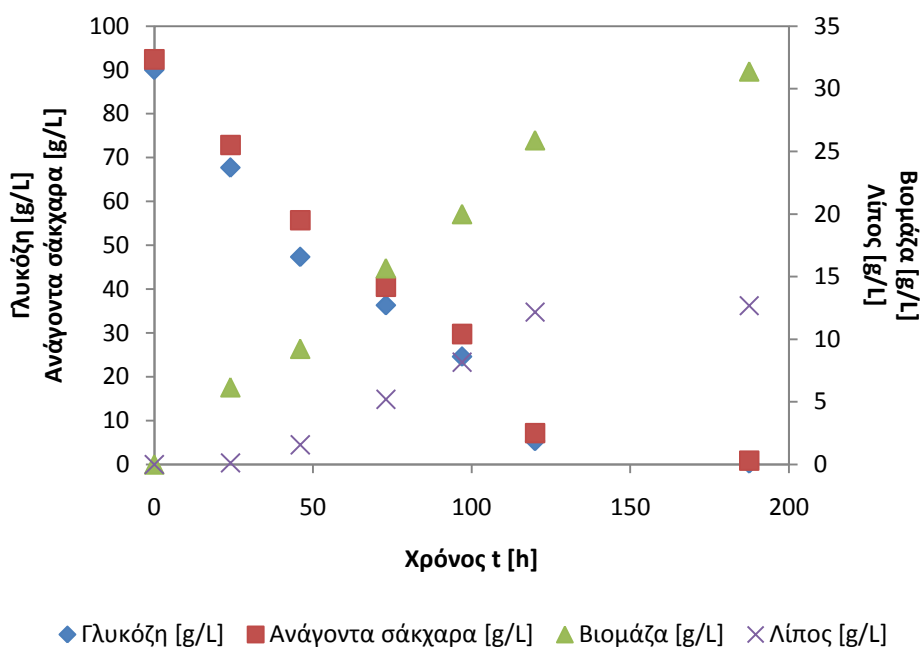
X: η παραγόμενη από τον μύκητα βιομάζα

L: το παραγόμενο από τον μύκητα μικροβιακό λίπος

Y_{LX}: συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας

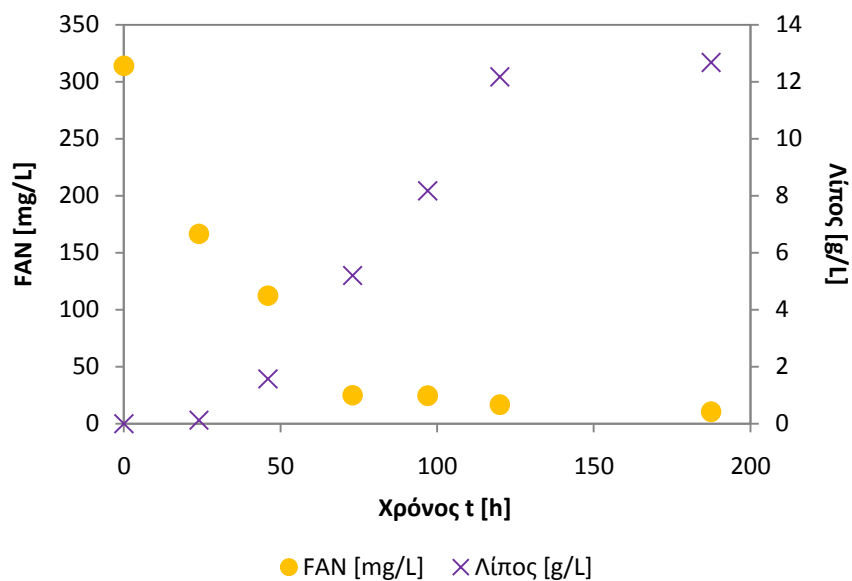
GLA (%): η επί % περιεκτικότητα του παραγόμενου από τον μύκητα ενδοκυτταρικού λίπους σε γ-λινολενικό οξύ (^{Δ6,9,12}C18:3, ω-6)

Η κινητική αύξησης, παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους και κατανάλωσης των αναγόντων σακχάρων και της γλυκόζης για τον *Mortierella isabellina* στο εν λόγω υπόστρωμα παρουσιάζεται σχηματικά στο παρακάτω γράφημα (Διάγραμμα 3.20), όπου, όπως φαίνεται, η παραγωγή βιομάζας και η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκίνησε λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό, χωρίς να παρατηρείται ιδιαίτερη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης. Επίσης, η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα και το μέγιστο παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος εντοπίστηκαν 187,5h μετά τον εμβολιασμό.



Διάγραμμα 3.20. Κινητική εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της κατανάλωσης αναγόντων σακχάρων και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα του 3^{ου} πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης

Αξιοσημείωτο είναι, επίσης, το γεγονός ότι ενώ η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπόστρωμα αυτού του πειράματος ήταν αρκετά υψηλότερη (περίπου κατά 20g/L) από εκείνη των δύο προηγούμενων πειραμάτων ζύμωσης υγρής κατάστασης, ωστόσο η μέγιστη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους που επιτεύχθηκε ήταν σχεδόν ίση με αυτή του 1^{ου} πειράματος και λίγο υψηλότερη από αυτή του 2^{ου} πειράματος (12,67g/L σε αυτό το πείραμα, έναντι 13,07g/L στο 1^ο πείραμα και 9,18g/L στο 2^ο πείραμα). Αυτό συνέβη, διότι στο 3^ο πείραμα ζύμωσης βυθού η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) ήταν πολύ υψηλότερη από ότι στα δύο πειράματα που προηγήθηκαν (313,89mg/L σε αυτό το πείραμα, έναντι 202,93mg/L στο 1^ο πείραμα και 270,11mg/L στο 2^ο πείραμα). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της λιποσυσσώρευσης του *Mortierella isabellina*, ιδιαίτερα στην αρχή της ζύμωσης, μέχρις ότου καταναλωθεί το 64% περίπου του FAN (πρώτες 46h). Όσα προαναφέρθηκαν γίνονται αντιληπτά από το διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 3.21). Ωστόσο, η αυξημένη πηγή αζώτου ευνόησε την κυτταρική ανάπτυξη του μύκητα, ως εκ τούτου η παραγόμενη βιομάζα άνευ λίπους ήταν πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τα δύο προηγούμενα πειράματα (18,70g/L έναντι 6,53g/L στο 1^ο πείραμα και 7,59g/L στο 2^ο πείραμα).



Διάγραμμα 3.21. Κινητική εξέλιξης του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και του ενδοκυτταρικού λίπους κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα του 3^{ου} πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης

Κατά τη διάρκεια του αυξητικού κύκλου του μύκητα *Mortierella isabellina* στο εν λόγω υπόστρωμα η μέτρηση του ποσοστού του διαλυμένου οξυγόνου στο περιβάλλον της ζύμωσης, δεν ήταν δυνατή λόγω την υψηλής πυκνότητας της καλλιέργειας σε βιομάζα, η οποία μάλιστα είχε ελαφρώς νηματώδη μορφή.

Ακολούθησε ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού λίπους στον αέριο χρωματογράφο. Λήφθηκαν δείγματα προς ανάλυση για κάθε μία από τις εξής φάσεις του αυξητικού κύκλου του μύκητα: αρχική εκθετική φάση (24h), μέση εκθετική φάση (73h), τελική εκθετική φάση (120h) και στατική φάση (187,5h) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παραθέτονται στον ακόλουθο πίνακα (πιν.3.17).

Πίνακας 3.17 Σύσταση του ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα *Mortierella isabellina* κατά την καλλιέργειά του στο θρεπτικό υπόστρωμα του 3^{ου} πειράματος

Χρόνος [h]	C14:0	C16:0	Δ^9 C16:1	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3
24	12,74	22,48	2,95	6,82	39,13	11,56	4,32
73	1,39	24,58	2,04	11,13	55,61	4,33	0,92
120	1,27	24,83	1,99	9,42	54,96	6,78	0,74
187,5	1,17	22,71	2,23	6,84	55,54	10,31	1,21

Από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.17) είναι εμφανές ότι και σε αυτό το πείραμα το επικρατέστερο λιπαρό οξύ στο μικροβιακό λίπος του μύκητα *Mortierella isabellina* είναι το ελαϊκό οξύ ($^{18}\text{C}18:1$), το οποίο μάλιστα αποτελεί πάνω από το 55% του συνολικού ενδοκυτταρικού λίπους. Η περιεκτικότητα του ενδοκυτταρικού λίπους σε γ -λινολενικό οξύ (GLA, $^{18}\text{C}18:3$) είναι χαμηλή γενικά, όμως η υψηλότερη που επιτεύχθηκε στα πλαίσια αυτής της μελέτης (4,32%). Αξίζει να σημειωθεί ότι στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του μικροοργανισμού (24h), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους ήταν μεν πολύ μικρή (μόλις 0,13g/L), αλλά η περιεκτικότητά του σε μυριστικό οξύ (C14:0) ήταν αυξημένη, ήτοι 12,74%, παρουσιάζοντας μία μεγάλη πτώση (της τάξης του 89%) μέσα στις επόμενες 50 ώρες ζύμωσης.

3.2.4 ΤΕΤΑΡΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Mortierella isabellina* ΣΕ ΥΔΡΟΛΥΜΑ ΑΜΥΛΟΠΡΩΤΕΪΝΟΥΧΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ

Στο τέταρτο πείραμα ζύμωσης υγρής κατάστασης το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας του μύκητα *Mortierella isabellina* προήλθε από υδρόλυση 48 ωρών 150g/L αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου. Τα ένζυμα που πραγματοποίησαν την υδρόλυση είχαν προέλθει από ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* τριών ημερών με συμμετοχή των στερεών της ζύμωσης στην διαδικασία της υδρόλυσης. Το προαναφερθέν υδρόλυμα, πριν χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό υπόστρωμα της ζύμωσης βυθού του *Mortierella isabellina*, υφίστατο αποστείρωση με φίλτρο. Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος μετά την αποστείρωση ήταν 404,57mg/L άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και 138,24g/L ανάγοντα σάκχαρα, εκ των οποίων 129,82g/L ήταν γλυκόζη.

Η ανάπτυξη του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα με την παραπάνω σύσταση ήταν πολύ ικανοποιητική, ομοίως και η λιποσυσσώρευση που επιτεύχθηκε. Συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας, ήταν 45,73g/L, με μέγιστη συσσώρευση λίπους 19,37g/L, δηλαδή η απόδοση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα έφτασε το 42,37%. Ωστόσο, η περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπους σε γ -λινολενικό οξύ δεν ξεπέρασε το 2,6%.

Στον πίνακα που ακολουθεί (πιν.3.18) παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων του υπερκειμένου της καλλιέργειας, καθώς και η βιομάζα και το ενδοκυτταρικό λίπος που παρήγαγε ο μικροοργανισμός κατά την διάρκεια αυτού του πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης. Επίσης, παρουσιάζεται και η περιεκτικότητα του ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα σε γ-λινολενικό οξύ ($\Delta^{6,9,12}\text{C18:3}$, ω-6).

Πίνακας 3.18 Αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων του υπερκειμένου της καλλιέργειας του μύκητα *Mortierella isabellina* και προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας, μικροβιακού λίπους και γ-λινολενικού οξέος

t [h]	A 540 nm	Αραιώση	Χαναγ. σακχάρων [g/L]	A 500 nm	Αραιώση	C _{Glc} [g/L]	A 570nm	Αραιώση	C _{FAN} [mg/L]	X [g/L]	L [g/L]	Y _{L/X} [g/g]	GLA (%)
0	1,2615	60	138,24	1,23	40	129,82	1,115	40	404,57	0	0	0	0
21	1,214	60	133,06	1,1765	40	124,17	0,9045	40	327,61	1,52	0,13	0,09	
43	1,144	60	125,42	1,118	40	117,99	0,4195	40	150,27	7,15	1,23	0,17	2,6
68,5	0,8755	60	96,13	0,8525	40	89,97	0,258	40	91,22	10,55	2,44	0,23	
93	0,706	60	77,64	0,6355	40	67,07	0,205	40	71,85	23,75	5,24	0,22	1,7
116,5	0,6725	40	49,32	0,605	20	31,93	0,3785	20	67,64	30,24	14,30	0,47	
140	0,5415	40	39,80	0,4585	20	24,20	0,366	20	65,36	34,90	14,86	0,43	1,0
210	0,12	40	9,14	0,016	20	0,84	0,364	20	64,99	41,45	17,86	0,43	
280	0,112	40	8,56	0,0095	20	0,50	0,353	20	62,98	45,73	19,37	0,42	0,5

t: η διάρκεια της ζύμωσης υγρής κατάστασης του *Mortierella isabellina* σε αυτό το πείραμα

A-540 nm, A-500 nm, A-570 nm: η απορρόφηση των δειγμάτων του υπερκειμένου της καλλιέργειας στα 540nm, 500nm, 570nm αντίστοιχα

Χαναγ.σακχάρων: η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

C_{Glc}: η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

C_{FAN}: η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

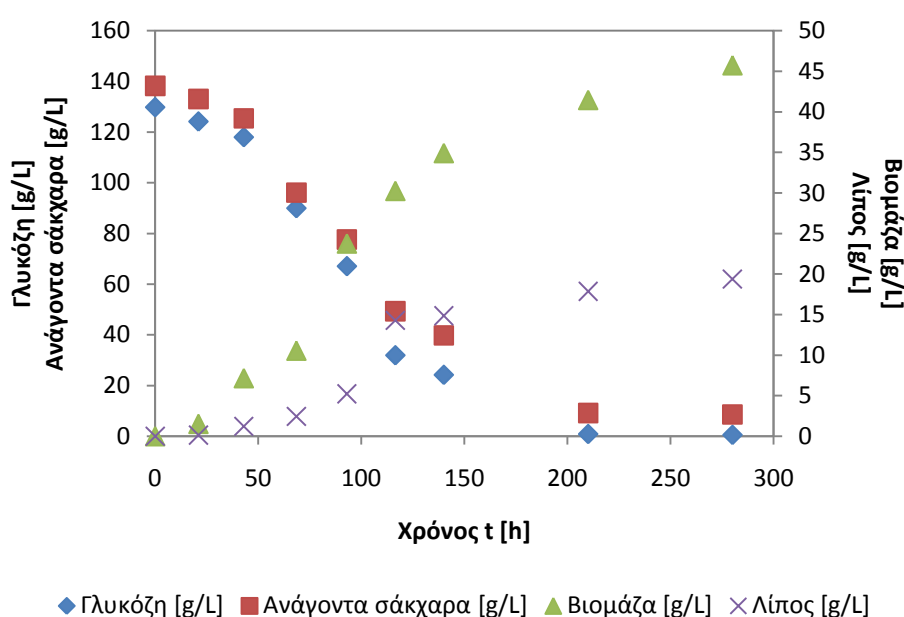
X: η παραγόμενη από τον μύκητα βιομάζα

L: το παραγόμενο από τον μύκητα μικροβιακό λίπος

Y_{L/X}: συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας

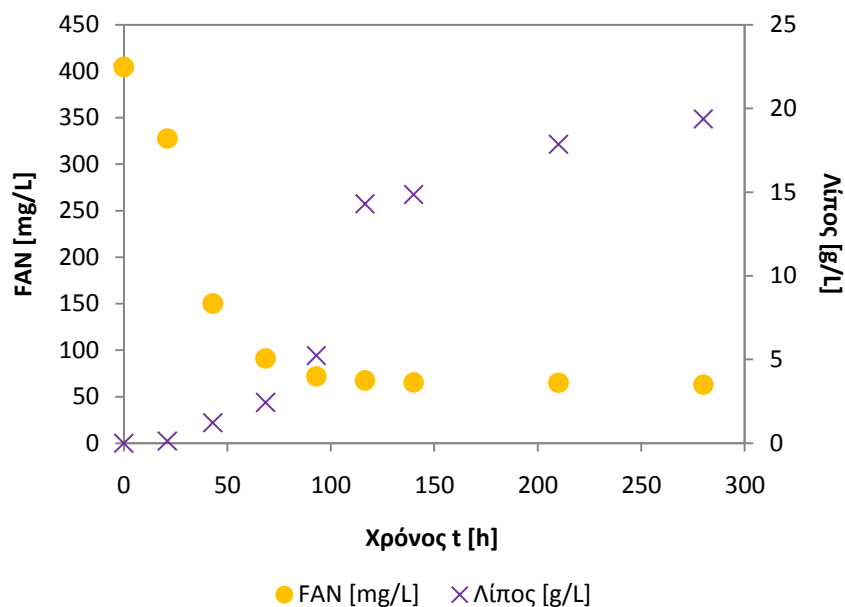
GLA (%): η επί % περιεκτικότητα του παραγόμενου από τον μύκητα ενδοκυτταρικού λίπους σε γ-λινολενικό οξύ ($\Delta^{6,9,12}\text{C18:3}$, ω-6)

Η κινητική αύξησης, παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους και κατανάλωσης των αναγόντων σακχάρων και της γλυκόζης για τον *Mortierella isabellina* στο εν λόγω υπόστρωμα παρουσιάζεται σχηματικά στο παρακάτω γράφημα (Διάγραμμα 3.22), όπου, όπως φαίνεται, η παραγωγή βιομάζας και η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκίνησε λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Επίσης, η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα και το μέγιστο παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος εντοπίστηκαν 280h μετά τον εμβολιασμό, οπότε και παρατηρήθηκε εξάντληση της γλυκόζης από το θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας, η οποία σηματοδότησε το τέλος της ζύμωσης υγρής κατάστασης του *Mortierella isabellina*.



Διάγραμμα 3.22. Κινητική εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της κατανάλωσης αναγόντων σακχάρων και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα του 4^{ου} πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης

Αξιοσημείωτο είναι, επίσης, ότι λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (404,57mg/L), ευνοήθηκε αρκετά η παραγωγή βιομάζας (πρωτογενής μεταβολισμός) ($X_{max}=45,73\text{g/L}$), αλλά περιορίστηκε η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (δευτερογενής μεταβολισμός) ($L_{max}=19,37\text{g/L}$), ιδιαίτερα στην αρχή της ζύμωσης, όπως φαίνεται και από το παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 3.23).



Διάγραμμα 3.23. Κινητική εξέλιξης του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και του ενδοκυτταρικού λίπους κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina* στο θρεπτικό υπόστρωμα του 4^{ου} πειράματος ζύμωσης υγρής κατάστασης

Κατά τη διάρκεια του αυξητικού κύκλου του μύκητα *Mortierella isabellina* στο εν λόγω υπόστρωμα η μέτρηση του ποσοστού του διαλυμένου οξυγόνου στο περιβάλλον της ζύμωσης, δεν ήταν δυνατή λόγω την υψηλής πυκνότητας της καλλιέργειας σε βιομάζα, η οποία μάλιστα είχε ελαφρώς νηματώδη μορφή.

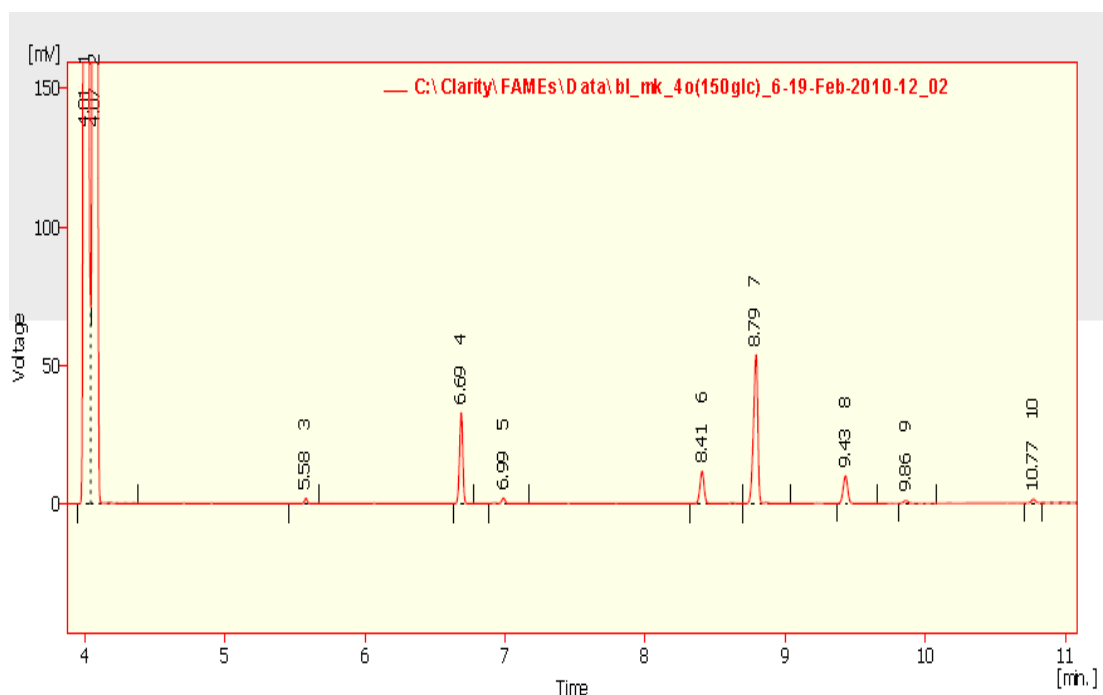
Ακολούθησε ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού λίπους στον αέριο χρωματογράφο. Λήφθηκαν δείγματα προς ανάλυση για κάθε μία από τις εξής φάσεις του αυξητικού κύκλου του μύκητα: αρχική εκθετική φάση (43h), μέση εκθετική φάση (93h), τελική εκθετική φάση (140h) και στατική φάση (280h) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παραθέτονται στον ακόλουθο πίνακα (πιν.3.19).

Πίνακας 3.19 Σύσταση του ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα *Mortierella isabellina* κατά την καλλιέργειά του στο θρεπτικό υπόστρωμα του 4^{ου} πειράματος

Χρόνος [h]	C14:0	C16:0	Δ^9 C16:1	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3
43	1,8	27,0	3,0	7,9	52,3	5,4	2,6
93	1,2	25,1	1,7	9,7	51,3	9,2	1,7
140	1,2	23,7	1,8	10,6	51,7	10,0	1,0
280	0,4	9,2	0,6	3,0	23,3	4,8	0,5

Από τον παραπάνω πίνακα (πιν.3.19) είναι εμφανές ότι και σε αυτό το πείραμα το επικρατέστερο λιπαρό οξύ στο μικροβιακό λίπος του μύκητα *Mortierella isabellina* είναι το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1). Ωστόσο, ενώ καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης αποτελούσε πάνω από το 50% του συνόλου του ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα, κατά την στατική φάση του αυξητικού κύκλου το ποσοστό αυτό μειώθηκε σε περίπου 23%, δηλαδή υπέστη μείωση μεγαλύτερη του 50%. Το ίδιο συνέβη και με την περιεκτικότητα του μυριστικού (C14:0), του παλμιτικού (C16:0) και του γ-λινολενικού οξέος (GLA, $\Delta^{6,9,12}$ C18:3). Αξιοσημείωτο είναι, επίσης, το γεγονός ότι η περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπος σε στεατικό (C18:0) και λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) ακολουθούσαν αυξητική πορεία καθ'όλη τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του μύκητα και υπόκειντο σε ξαφνική πτώση (μεγαλύτερης του 50%) κατά την στατική φάση ανάπτυξης.

Η μορφή του χρωματογραφήματος που λήφθηκε από τον αέριο χρωματογράφο (GC-FID) ήταν παρόμοια για όλα τα δείγματα μικροβιακού λίπους που χρειάστηκε να αναλυθούν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης και απεικονίζεται στο παρακάτω γράφημα (εικ.3.1).



Εικόνα 3.1 Χρωματογράφημα δείγματος μικροβιακού λίπους από αέριο χρωματογράφο (GC-FID)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, ερευνήθηκε η δυνατότητα παραγωγής μικροβιακού λίπους με χρήση αποκλειστικά ανανεώσιμων πρώτων υλών, ήτοι αποβλήτων και παραπροϊόντων βιομηχανιών τροφίμων, αντικαθιστώντας εμπορικά παρασκευάσματα θρεπτικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα του βασιδιομύκητα *Aspergillus awamori* 2B. 361 U2/1 να παράγει σύμπλεγμα αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων υποβαλλόμενο σε ζύμωση στερεάς κατάστασης, με χρήση παραπροϊόντων άλεσης σίτου ως μοναδικό θρεπτικό υπόστρωμα. Έπειτα, το παραληφθέν σύμπλεγμα ακατέργαστων ενζύμων χρησιμοποιήθηκε για την υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου βιομηχανίας προϊόντων ζαχαροπλαστικής. Το υδρόλυμα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κατά την καλλιέργεια (υπό μορφή ασυνεχούς ζύμωσης υγρής κατάστασης) του ελαιογόνου ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* ATHUM 2935, με σκοπό την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους.

Η παραγωγή και μελέτη του μικροβιακού λίπους αποτελεί ένα από τα θέματα αιχμής της σύγχρονης Βιοτεχνολογίας, όχι μόνο λόγω των πολλαπλών και εξαιρετικά ουσιωδών ρόλων που παίζουν τα λιπίδια στην φυσιολογική και βιοχημική ομοιόσταση του μικροοργανισμού, αλλά και λόγω των πολυάριθμων τρόπων συμβολής τους στην βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, τα λιπίδια των μυκήτων αποτελούν δομικούς λίθους των μεμβρανών και του κυτταρικού τοιχώματος, αποθησαυριστικά μόρια και σε κάποιες περιπτώσεις εξω-κυτταρικά προϊόντα (Losel, 1989). Ταυτόχρονα δύναται να χρησιμοποιηθούν για την βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου και ειδικότερα βρίσκουν χρήση στην παραγωγή προσθέτων σε τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας και στην παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής και φαρμακευτικών σκευασμάτων. Επίσης το μικροβιακό λίπος δύναται να βρει χρήση και στην παραγωγή καυσίμου βιολογικής προέλευσης (βιοντήζελ), εφαρμογή με μεγάλη οικολογική και οικονομική σημασία.

Κατά την μελέτη της παραγωγής και της δράσης του συμπλέγματος των αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων του μύκητα *Aspergillus awamori*, διαπιστώθηκε ότι προκειμένου να επιτευχθεί η πρακτικώς μέγιστη δυνατή μετατροπή του αμύλου σε γλυκόζη, κατά την υδρόλυση του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου, απαιτούνταν, υποβολή του προαναφερθέντος βασιδιομύκητα σε ζύμωση στερεής κατάστασης διάρκειας τριών ημερών,

υπό τις συνθήκες που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη (κεφ.2.1). Επίσης, εντοπίστηκε συσχέτιση της παρατηρούμενης στο υδρολυμένο απόβλητο συγκέντρωσης του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) με την συμμετοχή ή όχι των στερεών της ζύμωσης στην διεργασία της υδρόλυσης του αποβλήτου. Συγκεκριμένα, όταν τα στερεά της ζύμωσης στερεής κατάστασης συμμετείχαν στην διεργασία της υδρόλυσης, παρατηρούταν σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων στο υδρολυμένο απόβλητο ($48\pm 10\%$), σε σχέση με την περίπτωση που τα στερεά είχαν απομακρυνθεί πριν την έναρξη της υδρόλυσης, γεγονός που μαρτυρεί ότι ένα σημαντικό ποσοστό των πρωτεολυτικών ενζύμων δεν απελευθερωνόταν στο εναιώρημα που δημιουργούταν με προσθήκη νερού στα στερεά της ζύμωσης, αλλά συνέχιζε να βρίσκεται προσκολλημένο σε αυτά, με αποτέλεσμα κατά την απομάκρυνσή τους από το εναιώρημα να σημειώνεται απώλεια και ενός σημαντικού ποσοστού πρωτεολυτικών ενζύμων. Αντιθέτως, η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υδρολυμένο απόβλητο φάνηκε να μην επηρεάζεται από την συμμετοχή ή όχι των στερεών της ζύμωσης στην διεργασία της υδρόλυσης, αφού οι διαφορές της συγκέντρωσης γλυκόζης σε αυτές τις δύο περιπτώσεις ήταν πολύ μικρές ($9\pm 7\%$), σε σχέση με αυτές της συγκέντρωσης FAN.

Ωστόσο, η μετατροπή του αμύλου σε γλυκόζη δεν ήταν η θεωρητικώς μέγιστη δυνατή, κυρίως λόγω της ταχείας μείωσης της ενεργότητας των αμυλολυτικών ενζύμων (κυρίως της γλυκοαμυλάσης), από ποικίλους παράγοντες, όπως οι συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας που επικρατούσαν στο περιβάλλον της υδρόλυσης, η παραγωγή του προϊόντος (γλυκόζη) και η δράση της πρωτεάσης (Koutinas et al., 2001). Η υψηλότερη απόδοση αμύλου σε γλυκόζη επιτεύχθηκε όταν η συγκέντρωση του αμύλου ήταν 100g/L ($96,5\%$), παρά όταν ήταν 150g/L ($92,8\%$) (πάντα αναφερόμενη στην ίδια διάρκεια υδρόλυσης), σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Koutinas et al., 2001). Επίσης, επέκταση της διάρκειας υδρόλυσης από 24h σε 48h είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της απόδοσης του αμύλου σε γλυκόζη περίπου κατά 20%.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η φυσιολογική συμπεριφορά του ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* κατά την αύξηση του σε προϊόντα υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (προϊόντα υδρόλυσης αμυλούχου αποβλήτου). Ειδικότερα μελετήθηκαν οι βιοκινητικές παράμετροι της μικροβιακής αύξησης, η παραγωγή της κυτταρικής μάζας, η κατανάλωση του υποστρώματος, η συσσώρευση και ενίοτε η αποικοδόμηση του μικροβιακού λίπους, καθώς και η σύσταση του τελευταίου σε λιπαρά οξέα.

Ο μύκητας *M. isabellina* παρουσίασε ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη καλλιεργούμενος σε υποστρώματα υψηλής αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης, παράγοντας αξιοσημείωτα υψηλή συγκέντρωση βιομάζας (έως 45,73g/L) (πιν.4.1). Παρατηρήθηκε σε όλα τα πειράματα που έλαβαν χώρα ότι ο μικροοργανισμός κατανάλωσε ολόκληρη την ποσότητα της γλυκόζης, παρά την αρχικά υψηλή συγκέντρωσή της στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, και παρά την αρχικά υψηλή συγκέντρωση αζώτου (FAN), γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία (Paranikolaou et al., 2004). Ωστόσο, σε παρόμοια πειράματα με καλλιέργειες διαφόρων ελαιογόνων μυκήτων σε γλυκόζη, όπου ο λόγος των μορίων C/N ήταν υψηλός (π.χ. >90), παρατηρήθηκε ότι στα τελευταία στάδια ανάπτυξης ο ρυθμός αφομοίωσης της γλυκόζης εμφάνισε πτώση, με αποτέλεσμα να μένει μία ποσότητα σακχάρων του θρεπτικού μέσου ακατανάλωτη (Hannson and Dostalek, 1988, Certik and Shimizu, 2000, Gema et al., 2002). Σε αντίθεση με την περιεχόμενη στο θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζη, ένα ποσοστό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, της τάξεως του $9,5\pm 6,1\%$, παρέμενε ακατανάλωτο μετά το πέρας της ζύμωσης.

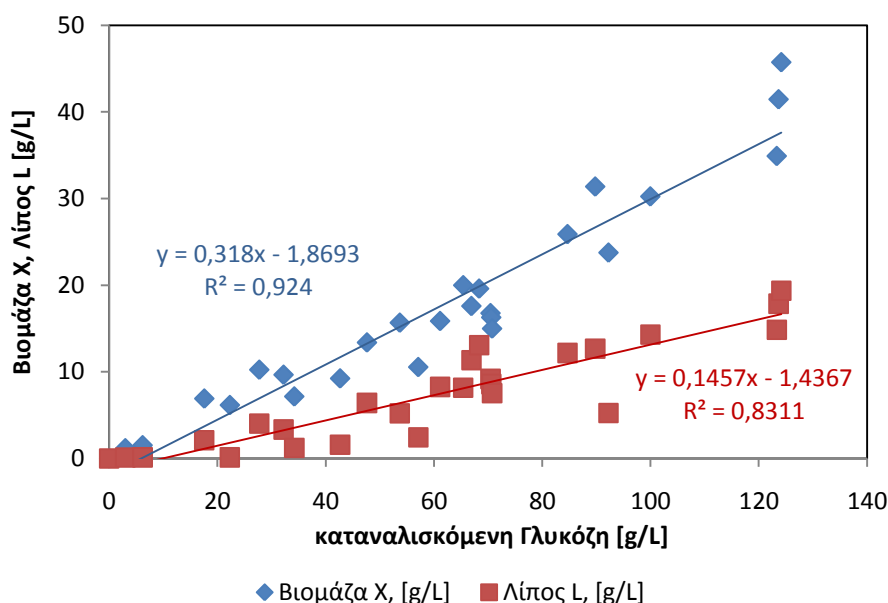
Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού λίπους αυξανόταν με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης στο θρεπτικό υπόστρωμα της ζύμωσης υγρής κατάστασης του μύκητα (πιν.4.1). Ωστόσο, στην περίπτωση που η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας παρέμενε σχεδόν σταθερή, αλλά αυξανόταν η αρχική συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, τότε παραγόταν περισσότερη βιομάζα, αλλά λιγότερο ενδοκυτταρικό λίπος (πιν.4.1), γεγονός που επιβεβαιώνει την περιοριστική δράση του αζώτου στην λιποσυσσωρευτική δράση των κυττάρων του μύκητα. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, προτείνεται ότι αποδόσεις βιομάζας μεγαλύτερες των 30g/L, συνοδευόμενες από σημαντική συσσώρευση αποθησαυριστικών λιπιδίων στα μικροβιακά κύτταρα (τουλάχιστον υψηλότερες από 30%w/w), αποτελούν προαπαιτούμενα για την βιομηχανική εφαρμογή της διεργασίας της ζύμωσης για παραγωγή μικροβιακού λίπους (Ratledge, 1994). Επομένως, το στέλεχος *M. isabellina* ATHUM 2935 αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο ελαιογόνο στέλεχος.

Πίνακας 4.1 Ποσοτικά δεδομένα του μύκητα *Mortierella isabellina* προερχόμενα από κινητικές σε θρεπτικό μέσο ποικίλης αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης

Αρχική C_{Glc} [g/L]	Αρχική C_{FAN} [mg/L]	Διάρκεια Ζύμωσης [h]	Βιομάζα X [g/L]	L_{max} [g/L]	$Y_{L/X}$ [g/g]
68,39	202,93	163,5	19,6	13,1	0,67
71,00	270,11	144,5	16,8	9,2	0,55
90,00	313,89	187,5	31,4	12,7	0,40
129,82	404,57	280	45,7	19,4	0,42

Αρχική C_{Glc} : η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης πριν την έναρξη αυτής
 Αρχική C_{FAN} : η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης πριν την έναρξη αυτής
 L_{max} : Το μέγιστο παραγόμενο μικροβιακό λίπος
 $Y_{L/X}$: Συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας

Οι συντελεστές απόδοσης της βιομάζας και του ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την συγκέντρωση της καταναλισκόμενης γλυκόζης ($Y_{X/Glc}$ and $Y_{L/Glc}$) παρουσίασαν σταθερές και αξιοσημείωτες τιμές (0,32 και 0,15 g/g αντιστοίχως), ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης του μύκητα (Διάγραμμα 4.1), κατά συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Ratledge, 1994, Papanikolaou et al., 2004). Επίσης, ο μύκητας *Mortierella isabellina* παρουσίασε πολύ καλύτερη συσσώρευση λίπους κατά την αύξηση στη γλυκόζη σε σχέση με την αύξηση στη φρουκτόζη, στο άμυλο, την πηκτίνη ή την λακτόζη (Papanikolaou et al., 2007). Άλλοι ελαιογόνοι ζυγομύκητες (π.χ. *Zygorhynchus moelleri*, *Cunninghamella echinulata*, *Rhizopus stolonifer*, *M. ramanniana* *M. vinacea*) καλλιεργούμενοι σε γλυκόζη παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη απόδοση σε λίπος σε σχέση με το υπό μελέτη στέλεχος (0.03–0.14 g/g - Hannson and Dostalek, 1988, Chen and Chang, 1996, Kavadia et al., 2001, Gema et al., 2002) (πιν.4.2). Ομοίως, χαμηλές αποδόσεις σε λίπος (0,08–0,11g/g) παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια ασυνεχών και συνεχών ζυμώσεων ελαιογόνων ζυμών και μυκήτων με χρήση διαλυτού αμύλου (Chen and Chang, 1996, Chen and Liu, 1997) ή γλυκερόλης (Sajbidor et al., 1988; Chen and Chang, 1996; Papanikolaou and Aggelis, 2002) ως πηγής άνθρακα της καλλιέργειας (πιν.4.2).



Διάγραμμα 4.1 Παραγόμενη βιομάζα X [g/L] και αποθησαυριστικά λιπίδια L [g/L] από τον ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* συναρτήσει της καταναλισκόμενης γλυκόζης [g/L] σε μέσο καλλιέργειας ποικίλης αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης.

Πίνακας 4.2 Παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους από ζύμες και μύκητες κατά την καλλιέργειά τους σε ποικίλα θρεπτικά υποστρώματα

Μικροοργανισμός	Κατηγορία μικροοργανισμού	Είδος Ζύμωσης	Υπόστρωμα	Βιομάζα X (g/L)	$Y_{L/X}$ (g/g)	L_{max} (g/L)	Βιβλιογραφική πηγή
<i>Apiotrichum curvatum</i>	ζύμη	batch	Διήθημα τυρογάλακτος (whey permeates)	19,70	0,58	11,40	Ykema et al. (1988)
<i>Apiotrichum curvatum</i>	ζύμη	continuous	Διήθημα τυρογάλακτος (whey permeates)	20,00	0,36	7,20	Ykema et al. (1988)
<i>Apiotrichum curvatum</i>	ζύμη	continuous	Διήθημα τυρογάλακτος (whey permeates)	21,00	0,20	4,20	Ykema et al. (1988)
<i>Apiotrichum curvatum</i>	ζύμη	fed-batch	Διήθημα τυρογάλακτος (whey permeates)	85,00	0,35	29,75	Ykema et al. (1988)
<i>Apiotrichum curvatum</i>	ζύμη	batch	Διήθημα τυρογάλακτος (whey permeates)	21,60	0,36	7,78	Ykema et al. (1988)
<i>Apiotrichum curvatum</i>	ζύμη	batch	Γλυκόζη	14,50	0,46	6,60	Hassan et al. (1993)
<i>Apiotrichum curvatum</i>	ζύμη	continuous	Τυρόγαλα	20,00	0,36	7,20	Ykema et al. (1988)
<i>Apiotrichum curvatum</i>	ζύμη	partial recycling	Διήθημα τυρογάλακτος (whey permeates)	91,40	0,33	30,16	Ykema et al. (1988)
<i>Apiotrichum curvatum</i>	ζύμη	batch	Διήθημα τυρογάλακτος (whey permeates)	23,20	0,18	4,18	Ykema et al. (1988)
<i>Candida curvata</i>	ζύμη	continuous	Λακτόζη	20,00	0,40	8,00	Brown et al. (1989)
<i>Candida curvata</i>	ζύμη	continuous	Ξυλόζη	15,00	0,37	5,60	Evans and Ratledge (1983)
<i>Candida curvata</i>	ζύμη	batch	Γλυκόζη	10,20	0,33	3,39	Evans and Ratledge (1983)

Πίνακας 4.2 Παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους από ζύμες και μύκητες κατά την καλλιέργειά τους σε ποικίλα θρεπτικά υποστρώματα

Μικροοργανισμός	Κατηγορία μικροοργανισμού	Είδος Ζύμωσης	Υπόστρωμα	Βιομάζα X (g/L)	$Y_{L/X}$ (g/g)	L_{max} (g/L)	Βιβλιογραφική πηγή
<i>Candida curvata</i>	ζύμη	batch	Σακχαρόζη	11,20	0,37	4,19	Evans and Ratledge (1983)
<i>Candida curvata</i>	ζύμη	batch	Λακτόζη	12,50	0,39	4,90	Evans and Ratledge (1983)
<i>Candida curvata</i>	ζύμη	batch	Αιθανόλη	8,50	0,30	2,56	Evans and Ratledge (1983)
<i>Candida curvata</i>	ζύμη	continuous	Αιθανόλη	11,50	0,35	4,03	Evans and Ratledge (1983)
<i>Candida curvata</i>	ζύμη	continuous	Λακτόζη	18,00	0,31	5,58	Evans and Ratledge (1983)
<i>Candida curvata</i>	ζύμη	continuous	Σακχαρόζη	16,00	0,28	4,48	Evans and Ratledge (1983)
<i>Candida curvata</i>	ζύμη	continuous	Γλυκόζη	13,50	0,29	3,90	Evans and Ratledge (1983)
<i>Candida curvata</i>	ζύμη	batch	Ξυλόζη	9,90	0,48	4,81	Evans and Ratledge (1983)
<i>Candida sp.</i>	ζύμη	batch	Γλυκόζη	4,01	0,40	1,62	Aggelis et al. (1996)
<i>Candida sp. 107</i>	ζύμη	continuous	Γλυκόζη	18,10	0,37	6,72	Gill et al. (1977)
<i>Cryptococcus albidus</i>	ζύμη	batch	Γλυκερόλη	1,37	0,44	0,60	Hansson and Dostalek (1986)
<i>Cryptococcus albidus</i>	ζύμη	batch	Μαννιτόλη	7,82	0,44	3,40	Hansson and Dostalek (1986)
<i>Cryptococcus albidus</i>	ζύμη	batch	Λακτόζη	6,46	0,26	1,70	Hansson and Dostalek (1986)
<i>Cryptococcus albidus</i>	ζύμη	batch	Μαλτόζη	8,22	0,38	3,10	Hansson and Dostalek (1986)
<i>Cryptococcus albidus</i>	ζύμη	batch	Γλυκόζη	8,23	0,40	3,30	Hansson and Dostalek (1986)
<i>Cryptococcus albidus</i>	ζύμη	batch	Ξυλόζη	7,27	0,33	2,40	Hansson and Dostalek (1986)
<i>Cryptococcus albidus</i>	ζύμη	batch	Αιθανόλη	-	-	-	Hansson and Dostalek (1986)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	continuous	Σακχαρόζη	16,00	0,28	4,48	Evans and Ratledge (1983)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	partial recycling	Τυρόγαλα	91,40	0,33	30,16	Ykema et al. (1988)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	recycling	Τυρόγαλα	85,00	0,35	29,75	Ykema et al. (1988)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	batch	Τυρόγαλα	21,60	0,36	7,78	Ykema et al. (1988)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	continuous	Γλυκόζη	10,80	0,32	3,45	Hassan et al. (1993)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	continuous	Αιθανόλη	11,50	0,35	4,03	Evans and Ratledge (1983)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	fed-batch	Γλυκερόλη	91,00	0,32	29,10	Meesters, van de Wal et al. (1996)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	continuous	Λακτόζη	18,00	0,31	5,58	Evans and Ratledge (1983)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	fed-batch	Γλυκερόλη	118,00	0,25	29,50	Meesters, Huijberts et al. (1996)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	continuous	Γλυκόζη	13,50	0,29	3,92	Evans and Ratledge (1983)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	continuous	Ξυλόζη	15,00	0,37	5,55	Evans and Ratledge (1983)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ζύμη	continuous	Τυρόγαλα	20,00	0,36	7,20	Ykema et al. (1988)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	μύκητας	batch	Άμυλο	29,63	0,27	8,00	Chen and Chang (1996)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη/Ελαιό	18,28	0,58	10,60	Certik et al. (1997)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	μύκητας	batch	Άμυλο	38,33	0,30	11,50	Chen and Liu (1997)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	8,98	0,49	4,40	Gema et al. (2002)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	9,21	0,07	0,63	Ahmed et al. (2006)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	μύκητας	batch	Απόβλητα τομάτας	25,16	0,31	7,80	Fakas et al. (2007)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	μύκητας	batch	Γλυκερόλη	6,20	0,53	3,30	Fakas et al. (2009)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	μύκητας	batch	Πηκτίνη	4,10	0,10	0,40	Papanikolaou et al. (2007)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	μύκητας	batch	Άμυλο	13,50	0,28	3,80	Papanikolaou et al. (2007)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	ζύμη	batch	Γλυκόζη & Ξυλόζη	20,50	0,62	12,60	Zhao et al. (2008)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	ζύμη	batch	Λάσπη αποβλήτων	9,40	0,68	6,40	Angerbauer et al. (2008)

Πίνακας 4.2 Παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους από ζύμες και μύκητες κατά την καλλιέργειά τους σε ποικίλα θρεπτικά υποστρώματα

Μικροοργανισμός	Κατηγορία μικροοργανισμού	Είδος Ζύμωσης	Υπόστρωμα	Βιομάζα X (g/L)	$Y_{L/X}$ (g/g)	L_{max} (g/L)	Βιβλιογραφική πηγή
<i>Mortierella isabellina</i>	μύκητας	batch	Άμυλο	10,40	0,36	3,70	Papanikolaou et al. (2007)
<i>Mortierella isabellina</i>	μύκητας	batch	Πηκτίνη	8,40	0,24	2,00	Papanikolaou et al. (2007)
<i>Mortierella isabellina</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	36,20	0,50	18,10	Papanikolaou et al. (2004)
<i>Mortierella isabellina</i>	μύκητας	batch	Γλυκερόλη	7,80	0,26	2,00	Fakas et al. (2009)
<i>Mortierella ramanniana</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	15,00	0,24	3,60	Hansson and Dostalek (1988)
<i>Mortierella ramanniana</i>	μύκητας	fed-batch	Γλυκόζη	62,60	0,50	31,30	Hiruta et al. (1997)
<i>Mucor circinelloides</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	6,16	0,73	4,50	Aggelis et al. (1988)
<i>Mucor circinelloides</i>	μύκητας	fed-batch	Οξικό οξύ	23,64	0,11	2,60	Immelman et al. 1997
<i>Mucor hiemalis</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	9,83	0,12	1,22	Ahmed et al. (2006)
<i>Mucor hiemalis</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	7,08	0,19	1,32	Ahmed et al. (2006)
<i>Mucor mucedo</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη/Ελαιο	19,35	0,62	12,00	Certik et al. (1997)
<i>Mucor rouxii</i>	μύκητας	continuous	Γλυκόζη	14,29	0,07	1,00	Hansson et al. (1989)
<i>Mucor sp. RRL001</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	13,38	0,44	5,84	Ahmed et al. (2006)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	7,58	0,13	0,98	Ahmed et al. (2006)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	9,22	0,13	1,18	Ahmed et al. (2006)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	6,89	0,06	0,44	Ahmed et al. (2006)
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	ζύμη	fed-batch	Γλυκόζη	151,50	0,48	72,72	Li et al. (2007)
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	ζύμη	fed-batch	Γλυκόζη	106,50	0,68	71,89	Li et al. (2007)
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	ζύμη	batch	Γλυκόζη	18,20	0,76	13,90	Li et al. (2006a)
<i>Rhodotorula gracilis</i>	ζύμη	continuous	Γλυκόζη	9,60	0,50	4,78	Choi et al. (1982)
<i>Trichosporon fermentans</i>	ζύμη	batch	Μαννόζη	22,70	0,50	11,50	Huang et al. (2009)
<i>Trichosporon fermentans</i>	ζύμη	batch	Γαλακτόζη	23,60	0,59	13,90	Huang et al. (2009)
<i>Trichosporon fermentans</i>	ζύμη	batch	Κυτταροβιόζη	15,80	0,66	10,40	Huang et al. (2009)
<i>Trichosporon fermentans</i>	ζύμη	batch	Μελάσα	36,40	0,35	12,80	Zhu et al. (2008)
<i>Trichosporon fermentans</i>	ζύμη	batch	Φρουκτόζη	21,50	0,41	8,80	Zhu et al. (2008)
<i>Trichosporon fermentans</i>	ζύμη	batch	Λακτόζη	16,90	0,50	8,40	Zhu et al. (2008)
<i>Trichosporon fermentans</i>	ζύμη	batch	Ξυλόζη	17,10	0,58	9,90	Zhu et al. (2008)
<i>Trichosporon fermentans</i>	ζύμη	batch	Υδρόλυμα άχυρου ορύζης	28,60	0,40	11,50	Huang et al. (2009)
<i>Trichosporon fermentans</i>	ζύμη	batch	Σακχαρόζη	19,50	0,63	12,20	Zhu et al. (2008)
<i>Trichosporon fermentans</i>	ζύμη	batch	Γλυκόζη	24,10	0,57	13,60	Zhu et al. (2008)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	ζύμη	batch	Βιομηχανικά λίπη	8,70	0,44	3,80	Papanikolaou et al. (2001)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	ζύμη	continuous	Γλυκόζη	9,20	0,25	2,30	Aggelis and Komaitis (1999)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	ζύμη	batch	Στεαρίνη	15,20	0,52	7,90	Papanikolaou et al. (2007)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	ζύμη	continuous	Γλυκερόλη	8,10	0,43	3,50	Papanikolaou and Aggelis (2002)
<i>Zygorhynchus moelleri</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	8,00	0,15	1,20	Kavadia et al. 2001
<i>Zygorhynchus moelleri</i>	μύκητας	batch	Γλυκόζη	5,08	0,20	1,02	Ahmed et al. (2006)
<i>Mortierella isabellina</i>	μύκητας	batch	Υδρόλυμα αμύλου	45,73	0,42	19,37	Παρούσα μελέτη

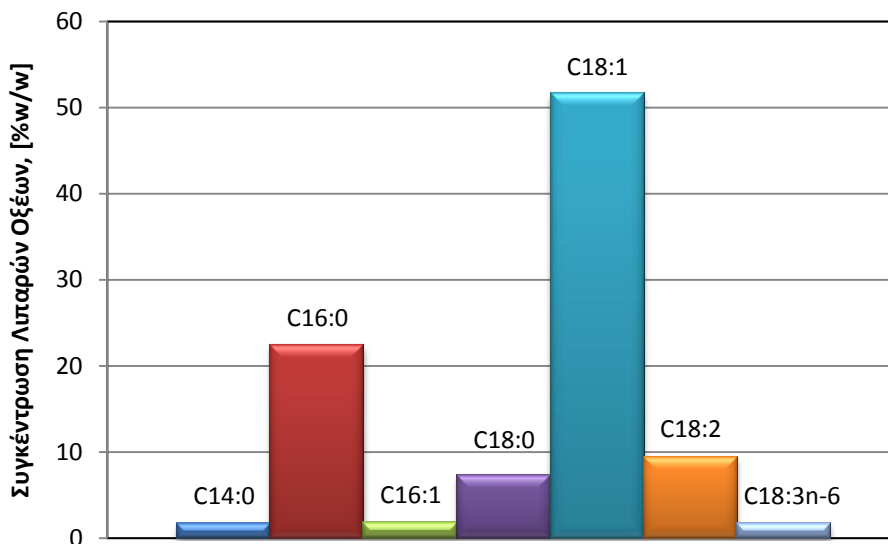
L_{max} : Το μέγιστο παραγόμενο μικροβιακό λίπος

$Y_{L/X}$: Συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας

Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι, μετά την εξάντληση της πηγής άνθρακα (γλυκόζης) από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας κατά την ζύμωση υγρής κατάστασης του *M.isabellina*, παρατηρήθηκε ανακατανάλωση των κυτταρικών λιπιδίων στη στατική φάση του αυξητικού κύκλου του μικροοργανισμού. Ο μύκητας, όπως πολλοί ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, λόγω εξάντλησης της πηγής άνθρακα, αποικοδόμησε και κατανάλωσε μέρος των συσσωρευμένων αποθεματικών του λιπιδίων προς παραγωγή βιομάζας ελεύθερης λίπους. (Holdsworth and Ratledge, 1988, Aggelis and Sourdis, 1997, Papanikolaou et al., 2001, Papanikolaou and Aggelis, 2003, Fakas et al., 2007). Στην παρούσα μελέτη, η απόδοση των λιπιδίων σε ελεύθερη λίπους βιομάζα ήταν μικρότερη από το θεωρητικό μέγιστο 1/1,7g/g (Ratledge, 2004), αλλά ήταν κοντά στο 1,0g/g (σε συμφωνία με τους Papanikolaou et al., 2004a, Fakas et al., 2007). Ωστόσο, η έλλειψη κάποιων θρεπτικών συστατικών, όπως ο σίδηρος και το μαγνήσιο, από το μέσο καλλιέργειας μπορεί να καταστείλει την αποικοδόμηση των λιπιδίων (Papanikolaou et al., 2004a). Η βιοαποικοδόμηση των μικροβιακών λιπιδίων είναι μια διεργασία η οποία λαμβάνει χώρα ανεξαρτήτως της πηγής άνθρακα του μέσου καλλιέργειας και έχει προτυποποιηθεί με τη χρήση αριθμητικών προτύπων (Aggelis and Sourdis, 1997, Papanikolaou and Aggelis, 2003). Γενικώς στους ελαιογόνους μύκητες αποικοδομούνται εκλεκτικά τα τριγλυκερίδια (Fakas et al., 2007). Εκλεκτική αποδόμηση των τριγλυκεριδίων έχει αναφερθεί και στα ελαιογόνα βακτήρια του γένους *Rhodococcus* (Alvarez et al., 2000). Η αποικοδόμηση των τριγλυκεριδίων παρέχει στο μικροοργανισμό ενέργεια και άνθρακα που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιομάζας. Έτσι, τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων μπορούν να διοχετευτούν στη μεταβολική οδό της β-οξειδωσης προς παραγωγή ενέργειας, ενώ επίσης παράγεται ελεύθερη λίπους βιομάζα.

Είναι απαραίτητο, επίσης, να σημειωθεί ότι κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina* δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στη σύσταση του ενδοκυτταρικού λίπους, σε σχέση με την διάρκεια της ζύμωσης υγρής κατάστασης, ούτε σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (Διάγραμμα 4.2). Σε όλα τα πειράματα ζυμώσεων βυθού του εν λόγω μύκητα, που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της μελέτης, το ελαϊκό οξύ (C18:1) ήταν το επικρατέστερο στο ενδοκυτταρικό λίπος του μικροοργανισμού. Επίσης, το παλμιτικό (C16:0) και το λινελαϊκό (C18:2) οξύ βρέθηκαν σε σημαντικές ποσότητες στα αποθησαυριστικά λιπίδια του μύκητα, ενώ το παλμιτελαϊκό (C16:1) και το στεατικό (C18:0) οξύ ανιχνεύτηκαν σε μικρές ποσότητες. Το γ-λινολενικό οξύ (C18:3n- 6), γνωστό και ως GLA, ανιχνεύτηκε σε όλα τα στάδια

ανάπτυξης του μύκητα *Mortierella isabellina* σε περιεκτικότητα $1,8 \pm 1,3\%$ w/w. Η χαμηλή συγκέντρωση γ -λινολενικού οξέος που ανιχνεύτηκε στα αποθησαυριστικά λιπίδια του μύκητα δεικνύουν ότι το στέλεχος *M.isabellina* ATHUM 2935 δεν επιδεικνύει αξιοσημείωτη ενεργότητα του ενζύμου $\Delta 6$ δεσατουράση, καθ'όλη τη διάρκεια του αυξητικού κύκλου του μύκητα. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία οι μικροοργανισμοί που παράγουν μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους τείνουν να παράγουν λιπίδια με χαμηλή περιεκτικότητα σε γ -λινολενικό οξύ και το αντίστροφο (Aggelis et al., 1988, Aggelis et al., 1990, Chen and Chang, 1996, Kavadia et al., 2001, Dyal et al., 2005). Η υψηλότερη τιμή GLA που ανιχνεύτηκε στα παρόντα πειράματα ήταν $3,12\%$ w/w.



Διάγραμμα 4.2 Σύσταση λιπαρών οξέων του παραγόμενου από τον ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* ενδοκυτταρικού λίπους σε μέσο καλλιέργειας ποικίλης αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης

Συνοψίζοντας, το στέλεχος *M. isabellina* ATHUM 2935 εφιστά το ερευνητικό ενδιαφέρον, αφού εμφανίζει αξιόλογη κυτταρική ανάπτυξη, αξιοσημείωτη ικανότητα κατανάλωσης γλυκόζης και σημαντική παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, όταν αναπτύσσεται σε υποστρώματα με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, όπως τα υδρολύματα του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, παρότι η περιεκτικότητα των λιπιδίων του σε GLA ήταν χαμηλή. Συνεπώς, ο μικροοργανισμός αυτός δυνητικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απορρύπανση του

περιβάλλοντος από τα πολυάριθμα, υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων, απόβλητα αγροτοβιομηχανιών, εκ των οποίων μεγάλο ποσοστό αποτελούν λύματα βιομηχανιών τροφίμων (π.χ. απόβλητα βιομηχανιών προϊόντων ζαχαροπλαστικής), τα οποία στην παρούσα φάση απορρίπτονται στο περιβάλλον χωρίς καμία προηγούμενη επεξεργασία. Κάτι τέτοιο αφενός θα συνέβαλε στη μείωση της ρυπαντική ισχύος των αποβλήτων και αφετέρου θα συντελούσε στην παραγωγή μικροβιακού λίπους (Papanikolaou et al., 2004a). Το λίπος αυτό θα μπορούσε να υποστεί καθαρισμό με τη μέθοδο των υπερκρίσιμων υγρών (Certik and Shimizu, 1999; Ratledge, 2004) προκειμένου να συμπυκνωθεί και να καθαριστεί το υψίστης σημασίας γ-λινολενικό οξύ, ενώ το υπόλοιπο λίπος θα μπορούσε να οδεύσει προς παραγωγή εναλλακτικού καυσίμου βιολογικής προελεύσεως (βιοντήζελ – biodiesel) (Αγγελής, 2007, Papanikolaou et al., 2008). Επιπροσθέτως, ο *M.isabellina* ATHUM 2935 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λιπιδίων υψηλής προστιθέμενης αξίας (PUFAs ή λίπος εξεζητημένης δομής τριγλυκεριδίων, όπως το λίπος του κακάο), μέσω βιομετατροπής των λιπιδίων του μύκητα, με ικανοποιητικές αποδόσεις μετατροπής (Papanikolaou et al., 2003).

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μία ακόμη απόδειξη της δυνατότητας ανάπτυξης και εφαρμογής της αειφόρου τεχνολογίας. Η χρήση των αγροτικών και βιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων ως θρεπτικά υποστρώματα για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αλματώδους αύξησης όλων των τομέων παραγωγής και διότι τα διάφορα αυτά απόβλητα και παραπροϊόντα παράγονται σε πολύ μεγάλες ποσότητες, με αποτέλεσμα η διαχείρισή τους να αποτελεί δυσεπίλυτο πρόβλημα για τη βιομηχανία (Peters, 2007). Παρά τον μεγάλο αριθμό μελετών που έχει εμφανιστεί στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την αξιοποίηση των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων, το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω απ' τα ζητήματα της βιομετατροπής τους συνεχίζεται αμείωτο (Peters, 2007). Η βιομετατροπή αγροτοβιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων σε λιπίδια φαρμακευτικού και διατροφικού ενδιαφέροντος είναι τεχνολογία μέγιστης αιχμής με εξαιρετική οικονομική σημασία. Αξίζει να σημειωθεί ότι 1kg λιπαρής ύλης του φυτού *Oenothera bienis* (με GLA 8-10% w/w επί της λιπαρής μάζας) κοστολογείται γύρω στα 40 US \$. Συνεπώς, από όλα τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η μελέτη των μικροοργανισμών δύναται να παίξει σπουδαίο ρόλο στην βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου, επιδρώντας θετικά σημαντικούς τομείς όπως η Οικολογία, η Οικονομία και η Φαρμακευτική.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Clarity - Chromatography SW

DataApex 2006
www.dataapex.com

Chromatogram Info:

File Name : C:\Clarity\FAMES\Data\bl_FAMES_standard-09-Dec-2009-10_24.PRM File Created : 12/9/2009 10:44:21 AM
Origin : Acquired Acquired Date : 12/9/2009 10:44:20 AM
Project : c:\Clarity\Projects\PHB.PRJ By : Administrator

Printed Version Info:

Printed Version : 12/9/2009 5:06:05 PM Printed Date : 12/14/2009 3:11:03 PM
Report Style : c:\Clarity\Common\Chromatogram.sty By : Administrator
Calibration File : None

Sample Info:

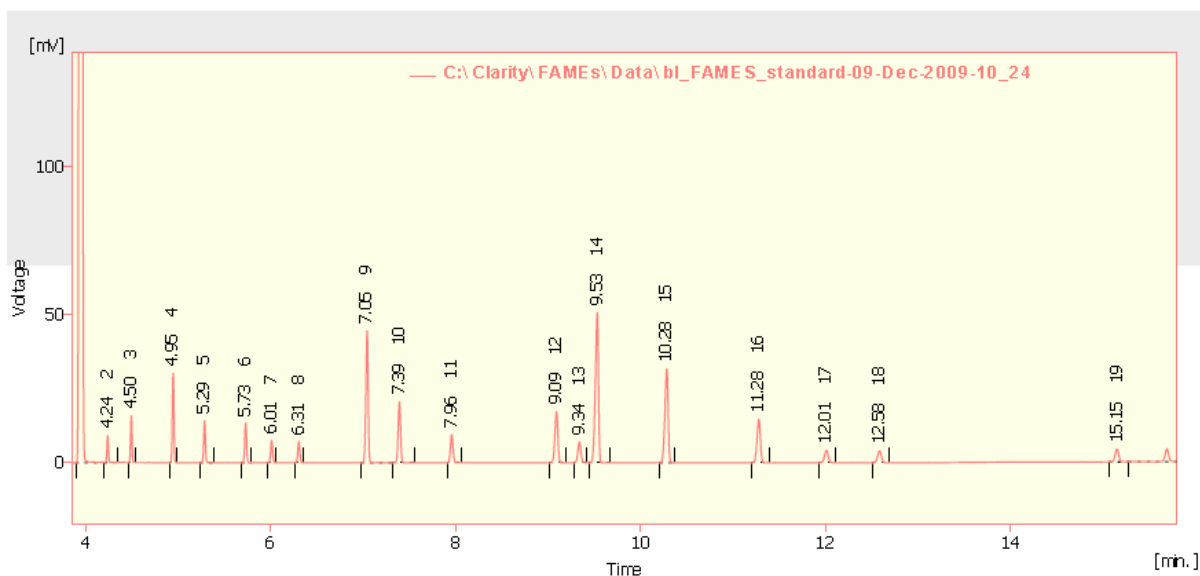
Sample ID : bl_FAMES_standard Amount : 0
Sample : PHB ISTD Amount : 0
Inj. Volume [ml] : 0 Dilution : 1

Method : C:\Clarity\FAMES\FAMES By : Administrator
Description : FAMES
Created : 10/10/2008 11:05 AM Modified : 12/9/2009 5:06 PM

Column : Detection :
Mobile Phase : Temperature :
Flow Rate : Pressure :
Note :

Autostop : 20.00 min External Start : Start Only, Down
Detector 1 : Signal 1 Range 1 : Bipolar, 1250 mV, 50.08 Samp. per Sec.
Subtraction Chromatogram : (None) Matching : No Change

Base : Not Used Calibration File : None Calculation : Uncal
Scale Factor : Not Used Units After Scaling : Not Used Uncal. Response : 0
Unretained Time : 0.00 min Column Length : 50.00 mm Column Calc. : From Width at 50% of Height
Result Table Reports : All Peaks Hide ISTD Peak : Enabled



Εικόνα Π.1 Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος λιπαρών οξέων

Result Table (Uncal - C:\Clarity\FAMES\Data\bl_FAMES_standard-09-Dec-2009-10_24)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	3.949	2935.754	1172.777	82.7	79.0	0.04
2	4.243	10.174	9.055	0.3	0.6	0.02
3	4.498	17.713	15.863	0.5	1.1	0.02
4	4.950	36.410	30.348	1.0	2.0	0.02
5	5.290	18.541	14.256	0.5	1.0	0.02
6	5.734	18.624	13.408	0.5	0.9	0.02
7	6.014	11.088	7.557	0.3	0.5	0.02
8	6.308	11.115	7.183	0.3	0.5	0.03
9	7.045	77.593	44.731	2.2	3.0	0.03
10	7.395	37.705	20.613	1.1	1.4	0.03
11	7.961	18.575	9.539	0.5	0.6	0.03
12	9.092	38.856	17.320	1.1	1.2	0.04
13	9.340	16.150	6.996	0.5	0.5	0.04
14	9.533	119.911	50.952	3.4	3.4	0.04
15	10.284	77.869	31.813	2.2	2.1	0.04
16	11.280	37.799	14.735	1.1	1.0	0.04
17	12.009	11.728	4.221	0.3	0.3	0.04
18	12.585	11.549	3.961	0.3	0.3	0.05
19	15.149	11.874	4.294	0.3	0.3	0.04
20	15.688	30.940	4.346	0.9	0.3	0.04
	Total	3549.969	1483.978	100.0	100.0	

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aggelis G. and Komaitis M., 1999. Enhancement of single-cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing in the presence of *Teuchrium polium* L. aqueous extract. *Biotechnol. Lett.* 21, pp. 747–749.

Aggelis G., Papadiotis G. and Komaitis M., 1997. Microbial fatty acid specificity. *Folia Microbiol. (Praha)* 42, pp. 117–120.

Aggelis, G., Pina, M. and Graille, J., 1990. Localisation de l'acide gamma linoléique dans les myceliums et les spores chez deux Mucorales. *Oléagineux* 45, pp. 229–232.

Aggelis, G., Ratomahenina, R., Arnaud, A., Galzy, P., Martin-Privat, P., Perraud, J.P., Pina, M. and Graille, J., 1988. Étude de l'influence des conditions de culture sur la teneur en acide gamma linoléique de souches de Mucor. *Oléagineux* 43, pp. 311–317.

Aggelis G., Sourdis J., 1997. Prediction of lipid accumulation – degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72, pp. 159–165.

Aggelis G., Stathas D., Tavoularis N. and Komaitis M., 1996. Composition of lipids produced by some strains of *Candida* species. Production of single-cell oil in a chemostat culture. *Folia Microbiologica* 41, pp. 299–302.

Ahmed S.U., Singh S.K., Pandey A., Kanjilal S. and Prasad R.B.N., 2006. Effects of various process parameters on the production of gamma-linolenic acid in submerged fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 44, pp. 283–287.

Alvarez H.M., Kalscheuer R. and Steinbüchel A., 2000. Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB40126. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, pp. 218–223.

Angerbauer C., Siebenhofer M., Mittelbach M. and Guebitz G.M., 2008. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology* 99, pp. 3051–3056.

Brown B.D., Hsu K.H., Hammond E.G. and Glatz B.A., 1989. A relationship between growth and lipid accumulation in *Candida curvata* D. J. *Ferment. Bioeng.* 68, pp. 344–352.

Certik M., Balteszova L., Sajbidor J., 1997. Lipid formation and linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, pp. 101–105.

Certik M. and Shimizu S., 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, pp. 1–14.

Certik M. and Shimizu S., 2000. Kinetic analysis of oil biosynthesis by an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, pp. 224–230.

Chen H.C. and Chang C.C., 1996. Production of γ -linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnol. Prog.* **12**, pp. 338–341.

Chen H.C. and Liu T.M., 1997. Inoculum effects on the production of γ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, pp. 137–142.

Das U.N., 1999. Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **61**, pp. 157-163.

Dyal S.D. and Narine S.S., 2005. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Research International* **38**, pp. 445-467.

Evans C.T. and Ratledge C., 1983. A comparison of the oleaginous yeast *Candida curvata* grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids* **18**, pp. 623–629.

Fakas S., Čertik M., Papanikolaou S., Aggelis G., Komaitis M., Galiotou-Panayotou M., 2008. γ -Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. *Bioresource Technology* **99**, pp. 5986-5990.

Fakas S., Galiotou-Panayiotou M., Papanikolaou S., Komaitis M. and Aggelis G., 2007. Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enz. Microb. Technol.* **40**, pp. 1321–1327.

Fakas S., Papanikolaou S., Batsos A., Galiotou-Panayotou M., Mallouchos A., Aggelis G., 2009. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy* **33**, pp. 573-580.

Fakas S., Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M. and Aggelis G., 2006. Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**, pp. 676-683.

Folch J., Lees M. and Slane-Stanley J., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, pp. 497–509.

- Gema H., Kavadia A., Dimou D., Tzagou V., Komaitis M. and Aggelis G., 2002. Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, pp. 303–307.
- Choi S.Y., Ryu D.D.Y. and Rhee J.S., 1982. Production of Microbial Lipid: Effects of Growth Rate and Oxygen on Lipid Synthesis and Fatty Acid Composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnology and Bioengineering.* XXIV, pp. 1165-1172.
- Gill C., Hall M. and Ratledge C., 1977. Lipid accumulation in an *Oleaginous Yeast* with possession of ATP: citrate lyase. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, pp. 231–239.
- Hansson, L. and Dostalek, M., 1986. Influence of cultivation conditions on lipid production by *Cryptococcus albidus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, pp. 12- 18.
- Hansson L. and Dostalek M., 1988. Effect of culture conditions on mycelian growth and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, pp. 240–246.
- Hansson L., Dostalek M., Srenby B., 1989. Production of γ -linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* in fed-batch and continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, pp. 223–227.
- Hassan M., Blanc P.J., Granger L.M., Pareilleux A. and Goma G., 1993. Lipid production by an unsaturated fatty acid auxotroph of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown in a single stage continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, pp. 483–488.
- Hiruta O., Yamamura K., Takebe H., Futamura T., Iinuma K., Tanaka H., 1997. Application of Maxblend fermentor for microbial processes. *J. Ferment. Bioeng.* 83, pp. 79–86.
- Holdsworth J.E., Ratledge C., 1988. Lipid turnover in oleaginous yeasts. *J Gen Microbiol* 134, pp. 339–346.
- Horrobin D.F., 1992. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog. Lipid Res.* 31, pp. 163-194.
- Hrelia S., Pession A., Buda R., Lorenzini A., Horrobin D.F., Biagi P.L. and Bordoni A., 1999. Concentration- and time-dependent effects of γ -linolenic acid supplementation to tumor cells in culture. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 60, pp. 235-241.
- Huang C., Zong M., Wu H. and Liu Q., 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology* 100, pp. 4535-4538.

Immelman M., Du Preez J.C., Kilian S.G., 1997. Effect of C:N ratio on gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* grown on acetic acid. *System. Appl. Microbiol.* 20, pp. 158–164.

Kavadia A., Komaitis M., Chevalot I., Blanchard F., Marc I. and Aggelis G., 2001. Lipid and gamma-linolenic acid accumulation in strains of *Zygomycetes* growing on glucose. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 78, pp. 341–346.

Koutinas A.A., Arifeen N., Wang R., Webb C., 2006. Cereal-based biorefinery development: Integrated enzyme production for cereal flour hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 97, pp. 61-72.

Koutinas A., Belafi-Bako K., Kabiri-Badr A., Tóth A., Gubicza L. and Webb C., 2001. Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides: Hydrolysis of Starch by an Enzyme Complex from Fermentation by *Aspergillus Awamori*. *Food and Bioproducts Processing* 79, pp. 41-45.

Li Y.H., Liu B., Zhao Z.B., Bai F.W., 2006. Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 22, pp. 650-656.

Li Y., Zhao Z. and Bai F., 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* 41, pp. 312-317.

Lie S., 1973. The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *J. Inst. Brew.* 79, pp. 37–41.

Lösel D.M., 1988. Fungal lipids. In *Microbial lipids*. Vol 1. Edited by C. Ratledge and S.G. Wilkinson. Academic Press, London. pp. 699–806.

Meesters P.A.E.P., Huijberts G.N.M. and Eggink G., 1996. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, pp. 575–579.

Meesters P.A.E.P., van der Wal H., Weusthuis R. and Eggink G., 1996. Cultivation of the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* in a new reactor with improved mixing and mass transfer characteristics (SUPER-R). *Biotechnol. Technics* 10, pp. 277–282.

Menéndez J., 2001. Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *European Journal of Cancer* 37, pp. 402-413.

Mengeaud V., Jano J.L., Fournel S., and Rampal P., 1992. Effects of eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid and prostaglandin E1 on three human colon carcinoma cell lines. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 47, pp. 313-319.

Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31, pp. 426–428.

Nano J.L., Nobili C., Girard-Pipau F. and Rampal P., 2003. Effects of fatty acids on the growth of Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 69, pp. 207–215.

Papanikolaou S. and Aggelis G., 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour. Technol.* **82**, pp. 43–49.

Papanikolaou S. and Aggelis G., 2003. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3 propanediol by *Clostridium butyricum*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 78, pp. 542–547.

Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Aggelis G. and Marc I., 2001. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek* **80**, pp. 215–224.

Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Marc I. and Aggelis G., 2002. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, pp. 308–312.

Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Fakas S., Komaitis M. and Aggelis G., 2007. Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, pp. 1060–1070.

Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Fakas S., Komaitis M. and Aggelis G., 2008. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology* 99, pp. 2419–2428.

Papanikolaou S., Komaitis M. and Aggelis G., 2004. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology* 95, pp. 287–291.

Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G. and Marc I., 2003. Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* growing on agro-industrial residues. *Current Microbiol* 46, pp. 124–130.

Papanikolaou S., Sarantou S., Komaitis M. and Aggelis G., 2004a. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media, *Journal of Applied Microbiology* **97**, pp. 867–875.

Peters D., 2007. Raw Materials. Advanced Biochemistry Engineering and Biotechnology 105, pp. 1-30.

Ratledge C., 1994. Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In: Kamel, B.S. and Kakuda, Y., Editors, 1994. Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids, Blackie Academic and Professional, London, pp. 235–291.

Ratledge C., 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. Biochemical Society Transactions 30, pp. 1047–1050.

Ratledge C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. Biochimie 86, pp. 807-815.

Roynette C.E., Calder P.C., Dupertuis Y.M. and Pichard C., 2004. n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. Clin Nutr.23 pp. 139–151.

Sajbidor J., Certik M. and Dobronova S., 1988. Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to Mucorales. Biotechnol. Lett. **10**, pp. 347–350.

van Beelen V.A., Roeleveld J., Mooibroek H., Sijtsma L., Bino R.J., Bosch D., Rietjens I.M., Alink G.M., 2007. A comparative study on the effect of algal and fish oil on viability and cell proliferation of Caco-2 cells. Food Chem Toxicol. 45, pp. 716-724.

Ykema A., Verbree E.C., Verwoert I.I.G.S., van der Linden K.H., Nijkamp H.J.J. and Smit H., 1990. Lipid production of revertants of Ufa mutants from the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. Applied Microbiology and Biotechnology 33, pp. 176-182

Ykema A., Verbree E.C., Kater M.M. and Smit Ho, 1988. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in whey permeate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29, 211-218.

Zhao X., Kong X., Hua Y., Feng B. and Zhao Z., 2008. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. European Journal of Lipid Science and Technology 110, pp. 405-412.

Zhu L.Y., Zong M.H. and Wu H., 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. Bioresource Technology **99**, pp. 7881–7885.

Αγγελής Γ., 2007. Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. Εκδόσεις Σταμούλη.

Κατινάκης Π., 2004. Βιοχημεία. Εκδόσεις Έμβρυο.