

# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΘΕΜΑ:** «Μελέτη της βιομετατροπής μιγμάτων ακάθαρτης γλυκερόλης και υγρών αποβλήτων ελαιουργείας προς παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας με χρήση στελεχών του ζυμομύκητα *Yarrowia lipolytica*»

**Παπαφώτης Νικόλαος**

Επιβλέπων καθηγητής: Σεραφείμ Παπανικολάου

ΑΘΗΝΑ 2018

# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΘΕΜΑ:** «Μελέτη της βιομετατροπής μιγμάτων ακάθαρτης γλυκερόλης και υγρών αποβλήτων ελαιουργείας προς παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας με χρήση στελεχών του ζυμομύκητα *Yarrowia lipolytica*»

**Παπαφώτης Νικόλαος**

Επιβλέπων καθηγητής: Σεραφείμ Παπανικολάου

ΑΘΗΝΑ 2018

# ΠΜΣ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΑ

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΘΕΜΑ:** «Μελέτη της βιομετατροπής μιγμάτων ακάθαρτης γλυκερόλης και υγρών αποβλήτων ελαιουργείας προς παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας με χρήση στελεχών του ζυμομύκητα *Yarrowia lipolytica*»

### Εξεταστική επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

**Παπαφώτης Νικόλαος**

ΑΘΗΝΑ 2018

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα ερευνητική μελέτη διεξήχθη στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Προτού παρουσιάσω όμως τα αποτελέσματά της, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους σε άριστο κλίμα και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Παπανικολάου Σεραφείμ για τις συμβουλές του καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης αυτής, καθώς και για την άριστη συνεργασία μας. Θέλω να ευχαριστήσω επίσης θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Δημήτρη Σαρρή του τμήματος Επιστήμης των Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Αιγαίου για την καθοδήγηση και διαρκή συμπαράσταση του στην μελέτη αυτήν. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους: Ουρανία Καλαντζή, Δημήτρη Λαδάκη, Βαγγέλη Ξενόπουλο, Έρη Τσούκο, Ροζανίνα Φιλιπούση, Σοφία Μάινα και Κατερίνα Παπαδάκη για τις επιστημονικές τους συμβουλές.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να πώ ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ από καρδιάς στους φίλους και συμφοιτητές μου για όλη την υποστήριξη τους και τις πολύ όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε αυτά τα δύο χρόνια.

Τέλος, χρωστάω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου που βρίσκονται συνεχώς στο πλευρό μου και πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Είναι συνεχώς δίπλα μου να με στηρίζουν να πετύχω τους στόχους μου.

Παπαφώτης Νικόλαος

Αθήνα 2018

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>4</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)</b> .....	<b>11</b>
1.1.1 Γενικά στοιχεία .....	11
1.1.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγρών απόβλητων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) και σύστασή τους .....	15
1.1.3 Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ουσιών στα ΥΑΕ.....	19
1.1.4 Περιβαλλοντικά προβλήματα από την ανεξέλεγκτη διάθεση των απόβλητων ελαιουργείων .....	20
<b>1.2 Γλυκερόλη</b> .....	<b>23</b>
1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά γλυκερόλης.....	23
1.2.2 Κλιματική αλλαγή και ανάγκη χρήσης των βιοκαυσίμων .....	26
1.2.3 Βιοντίζελ και διεργασία παραγωγής του .....	27
1.2.4 Η γλυκερόλη ως παραπροϊόν της παραγωγής βιοντίζελ .....	29
<b>1.3 Ζύμες – Η ζύμη <i>Yarrowia lipolytica</i></b> .....	<b>31</b>
1.3.1 Ζύμες: Γενικά στοιχεία .....	31
1.3.2 Η ζύμη <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	33
1.3.3 Βιοτεχνολογικές χρήσεις της ζύμης <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	34
<b>1.4 Παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα από την ζύμη <i>Yarrowia lipolytica</i></b> .....	<b>35</b>
1.4.1 Πολυόλες .....	35
1.4.2 Ενδοπολυσακχαρίτες .....	37
1.4.3 Κιτρικό οξύ.....	39
1.4.4 Λιπίδια .....	42
<b>1.5 Σκοπός της μελέτης</b> .....	<b>47</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>49</b>
2.1 Χαρακτηριστικά στοιχεία και προδιαγραφές ΥΑΕ- γλυκερόλης.....	50
2.2 Βιολογικό υλικό .....	50
2.3 Συνθήκες καλλιέργειας .....	51
2.3.1 Παρασκευή υγρού εμβολίου.....	51
2.3.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας .....	51
2.3.3 Ανάλυση πειραματικών σταδίων.....	52
2.4 Αναλύσεις .....	54
2.4.1 Προσδιορισμός και διόρθωση του pH στο μέσο ανάπτυξης της ζύμης .....	54
2.4.2 Προσδιορισμός βιομάζας.....	54

2.4.3 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS) .....	55
2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS).....	55
2.4.5 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους .....	56
2.4.6 Μεθυλεστεροποίηση.....	57
2.4.7 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC) .....	58
2.4.8 Ανάλυση με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)....	58
2.4.9 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ουσιών .....	59
2.4.10 Μελέτη αποχρωματισμού .....	61
<b>3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>62</b>
3.1 Συγκριτική αξιολόγηση των δύο στελεχών σε κωνικές φιάλες ( $S_0=70$ g/L γλυκερόλης) χωρίς προσθήκη υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου ( $Pho=0$ gr/L) .....	64
3.2 Συγκριτική αξιολόγηση των δύο στελεχών σε κωνικές φιάλες ( $S_0=70$ g/L γλυκερόλης) με προσθήκη υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου σε συγκεντρώσεις φαινολικών $Pho=1$ gr/L, $Pho=2$ gr/L και $Pho=3,5$ gr/L. ....	71
3.3 Συγκριτική αξιολόγηση ζύμωσης (fed-batch) σε βιοαντιδραστήρα του στελέχους <i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5032 ( $S_0=70$ g/L γλυκερόλης) χωρίς προσθήκη ΥΑΕ και με προσθήκη ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις φαινολικών $Pho=3,5$ gr/L.....	86
3.4 Ποιοτικός προσδιορισμός της σύστασης του μικροβιακού λίπους που παρήχθηκε στις ζυμώσεις. ....	93
3.5 Αποτελέσματα αναλύσεων αποχρωματισμού- αποφαινώσεως. ....	96
<b>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>98</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>110</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) είναι τα κύρια υποπροϊόντα της επεξεργασίας του ελαιοκάρπου για την παραλαβή του ελαιολάδου. Η εναπόθεση των αποβλήτων αυτών, χωρίς μάλιστα να έχει προηγηθεί κατεργασία, είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται συχνά και αποτελεί μεγάλο παράγοντα ρύπανσης για τις ελαιοκομικές περιοχές και μεγάλο πρόβλημα για την βιομηχανία. Πολλές μελέτες στρέφουν την προσοχή τους στην χρήση υποστρωμάτων με βάση τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου για διάφορες μικροβιακές ζυμώσεις. Η χρήση και προσθήκη των ΥΑΕ στο μέσο καλλιέργειας διαφόρων μικροοργανισμών, αποτελεί μία ελπιδοφόρο μέθοδο βιοτεχνολογικής επεξεργασίας και απορρύπανσης των απόνερων αυτών με ταυτόχρονη παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί ραγδαία αύξηση στην παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως του βιοντίζελ. Παραπροϊόν της παραγωγής βιοντίζελ, είναι η ακάθαρτη γλυκερόλη με εμπορική αξία αρκετά χαμηλή (ή και μηδενική) η οποία παράγεται σε τεράστιες ποσότητες σε παγκόσμιο επίπεδο. Αποτελεί ένα υποσχόμενο υλικό εκκίνησης για παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η ικανότητα των στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 και ACA-YC 5032 να αναπτύσσονται σε υποστρώματα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη εμπλουτισμένη με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών. Η μοναδικότητα της μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι για πρώτη φορά μελετάται η ικανότητα της *Yarrowia lipolytica* να αναπτύσσεται σε συνδυασμό ΥΑΕ-γλυκερόλης για την παραγωγή βιομάζας, μεταβολικών προϊόντων (πολυολών και κιτρικού οξέος) και δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακό λίπος και ενδοπολυσακχαρίτες). Ουσιαστικά τα ΥΑΕ χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα ως υπόστρωμα και ως νερό ζύμωσης προκειμένου να αραιωθεί η (συμπυκνωμένη) ακάθαρτη γλυκερόλη, σε μία προσέγγιση αειφορίας, βιοοικονομίας και προσπάθειας εξοικονόμησης υδάτινων πόρων. Οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν σε υπόστρωμα ΥΑΕ με διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών και σταθερές συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας. Η γλυκερόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαχωρισμένη και καθαρότητας 88.5% κατά βάρος. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες βυθού σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα γλυκερόλη,

με αρχική συγκέντρωση ~70 g/L. Σε πρώτο στάδιο δεν προστέθηκαν στις καλλιέργειες Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ). Αυτές οι ζυμώσεις αποτέλεσαν τις ζυμώσεις αναφοράς. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις, στις οποίες επικράτησαν οι ίδιες συνθήκες με τις ζυμώσεις αναφοράς (pH=5,5-6,0, ανάδευση: 180±5 rpm, T=28±1°C). Επίσης, η σύσταση του θρεπτικού υλικού ήταν ίδια με αυτή των ζυμώσεων αναφοράς με την μόνη διαφορά ότι προστέθηκαν ΥΑΕ σε ποικίλους όγκους ώστε οι αρχικές συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών (Pho) στο μέσο της καλλιέργειας να είναι ~1g/L, ~2g/L και ~3,5g/L αντίστοιχα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ασυνεχής (batch) και ημι-συνεχής τροφοδοτούμενη ζύμωση (fed-batch) του στελέχους *Y. Lipolytica* ACA-YC 5032 σε βιοαντιδραστήρα όγκου 4L και ενεργού όγκου 2L. Όλες οι ζυμώσεις έλαβαν χώρα σε περιοριστικές σε N συνθήκες.

Σε όλες τις προαναφερθείσες ζυμώσεις πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας, καθώς και του παραγόμενου μικροβιακού λίπους. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών. Το παραγόμενο λίπος ύστερα από μεθυλεστεροποίηση που πραγματοποιήθηκε οδηγήθηκε για ανάλυση στον αεριοχρωματογράφο. Πραγματοποιήθηκαν ακόμα αναλύσεις αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού σε όλες τις ζυμώσεις με προσθήκη ΥΑΕ.

Στις ζυμώσεις βυθού, που πραγματοποιήθηκαν, βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στη ζύμωση αναφοράς του στελέχους ACA-YC 5029, η οποία έφθασε τα 12,3 g/L. Η αντίστοιχη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας για το στέλεχος ACA-YC 5032 έφθασε τα 11,3 g/L και παρατηρήθηκε στην ζύμωση αναφοράς και στις ζυμώσεις με συγκεντρώσεις φαινολικών Pho ~1g/L και Pho ~2g/L. Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους και για τα δύο στελέχη παρατηρήθηκε στη ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho ~2 g/L, η οποία έφθασε τα 2,0 g/L. Η προσθήκη ΥΑΕ στο μέσο της καλλιέργειας δεν επηρέασε τις ζυμώσεις. Η μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος για το ACA-YC 5029 ( $C_{it_{max}}$ ) έφθασε τα 40,2 g/L στην ζύμωση αναφοράς με συντελεστή απόδοσης κιτρικού ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ( $Y_{Cit/Glcl}$ ) ίσο με 0,60 g/g, ενώ για το ACA-YC 5032 έφθασε τα 44,1 g/L στην ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho ~3,5 g/L με  $Y_{Cit/Glcl}=0,64$  g/g. Στην ημισυνεχή τροφοδοτούμενη ζύμωση χωρίς προσθήκη ΥΑΕ, που έλαβε χώρα στο βιοαντιδραστήρα με το στέλεχος ACA-YC 5032, το λίπος έφτασε τα 3,08 g/L, και η βιομάζα έφτασε τα 8,03 g/L. Στην ίδια ζύμωση παρατηρήθηκε και η μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος από όλες τις ζυμώσεις, η οποία έφθασε τα 105,7 g/L ( $Y_{Cit/Glcl} \sim 0,86$  g/g). Από τις αναλύσεις αποφαινόλωσης και



αποχρωματισμού, η αποφαινόλωση έφθασε σε ποσοστό ~10% w/w και ο αποχρωματισμός σε ποσοστό ~30% και για τα δύο στελέχη. Με την βοήθεια της αεριοχρωματογραφίας βρέθηκε ότι το μικροβιακό λίπος που παράχθηκε και από τα δύο στελέχη αποτελούνταν από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα: παλμιτικό οξύ (C16:0), παλμιτελαϊκό οξύ ( $\Delta^9$ C16:1), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ ( $\Delta^9$ C18:1), λινελαϊκό οξύ ( $\Delta^{9,12}$ C18:2), με κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλες τις ζυμώσεις να αποτελεί το ελαϊκό οξύ ( $\Delta^9$ C18:1). Η αύξηση των φαινολικών στο μέσο της καλλιέργειας, ευνοεί την συσσώρευση λιπιδίων με ολοένα μεγαλύτερο ποσοστό σε ελαϊκό οξύ.

**Λέξεις κλειδιά:** *Yarrowia lipolytica*, υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), κίτρινο οξύ, πολυόλες, ελαιογόνος ζύμη.

## Abstract

Olive mill wastewaters (OMW) are the major effluent deriving from olive oil production and is considered as an agro-industrial waste difficult to be treated. Crude glycerol is the main by-product of biodiesel production. Tremendous quantities of glycerol produced pose serious environmental impact. Aim of this study was to assess the ability of *Yarrowia lipolytica* strains ACA-YC 5029 and ACA-YC 5032 to grow on nitrogen-limited submerged shake-flask and bioreactor cultures in media including crude glycerol and OMW, and produce biomass, cellular lipids, citric acid and polyols. Moreover, the ability of the strains to simultaneously decolorize the media (dark color occurring due to OMW presence) was also studied. The rationale of the present investigation is to (partially or complete) replace tap water employed in order to dilute crude glycerol, with olive mill wastewaters, in the frame of bioeconomy, circular economy and water use minimization.

All cultures contained glycerol as sole source of carbon and nitrogen-limiting conditions were used. Firstly, submerged fermentations were conducted in Erlenmeyer flasks of 250 ml, using glycerol as a carbon source at initial concentration of 70 g/L, while at first level, olive mill wastewaters (OMWs) were not added to the cultures. The aforementioned cultures formed the reference point for the subsequent cultures (i.e. controls). Then, fermentations were carried out in the same conditions as the controls (pH = 5,5-6,0, (180 ± 5 rpm), T = 28 ± 1 °C), with the exception that various volumes of OMW and tap water were added in the blended media, offering initial concentration of phenolic compounds (Ph<sub>0</sub>) of ~1.0 g/L, ~2.0 g/L and ~3.5 g/L (in the latter case, no tap water was added but only OMW). Finally, a batch and fed-batch fermentation of ACA-YC 5032 strain was carried out in a 4L bioreactor, with working volume of 2 L.

In all the above-mentioned fermentations carried out, dry microbial mass was determined and the produced microbial lipids were quantified. Furthermore, the intracellular polysaccharides were determined. The produced lipids, after methyl esterification conducted, was analysed in relation to its FA composition.

In the case of submerged fermentations the largest concentration of biomass was observed in the control culture of the strain ACA-YC 5029 and was 12,3 g/L. The respective maximum biomass for strain ACA-YC 5032 was 11,3 g/L and was observed in control fermentation and in fermentations with phenolic concentrations Ph<sub>0</sub> ~1.0 g/L,

and Pho ~2.0 g/L. Max lipid production for both strains was identified in fermentations with phenolic concentrations Pho ~2.0 g/L and was 2,0 g/L. Citric acid production was not affected by OMW addition. Maximum citric acid production for ACA-YC 5029 was 40,2 g/L and was observed in control fermentation ( $Y_{Cit/Glcl}$  ~0,60 g/g), while Citmax for ACA-YC 5032 was 44,1 g/L and was observed in fermentation with phenolic concentration ( $Y_{Cit/Glcl}$  ~0,64 g/g). In the case of fed-batch fermentation without the addition of OMW, total cellular lipid ( $L_{max}$ ) reached 3,08 g/L and the biomass reached 8,03 g/L for strain ACA-YC 5032. In the same fermentation the greatest citric acid production from all fermentations was observed and was 105,7 g/L ( $Y_{Cit/Glcl}$  ~0,86 g/g). Partial removal of color (~30%) and of phenolic compounds (~10% w/w) of the blended media occurred for both strains. Finally, it was found that lipid for both ACA-YC 5029 and ACA-YC 5032 strains, consisted of the following fatty acids: palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid ( $\Delta^9$ C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid ( $\Delta^9$ C18:1) and linoleic acid ( $\Delta^{9,12}$ C18:2) with the dominant fatty acid in all the fermentations being oleic acid ( $\Delta^9$ C18:1). Fatty acid analysis of microbial lipid demonstrated that OMW addition in the blended media favored the production of oleic acid.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*, olive mill wastewater (OMW), citric acid, polyols, oleaginous yeast.

## 1.1Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)

### 1.1.1 Γενικά στοιχεία

Ο ελαιοπαραγωγικός κλάδος αποτελεί βασικό πυλώνα της βιομηχανίας τροφίμων για τις χώρες της Μεσογείου και έναν από τους σημαντικότερους τομείς της γεωργικής παραγωγής της χώρας μας. Η παραγωγή τόσο της ελιάς όσο και του ελαιόλαδου εντοπίζεται κυρίως στις χώρες της Ευρώπης όπου παράγεται σχεδόν το 80,2 % της παγκόσμιας παραγωγής ελαιόλαδου (περίπου 2.056.200 τόνοι, κατά μέσο όρο, για τις ελαιοκομικές περιόδους 1999/2000 – 2002/2003) (Νιαουνάκης & Χαλβαδάκης, 2006). Η μεγαλύτερη Ευρωπαϊκή παραγωγή συγκεντρώνεται στη λεκάνη της Μεσογείου και παίζει σημαντικό ρόλο για την αγροτική οικονομία, την τοπική κληρονομιά και το περιβάλλον (Εικόνα 1.1).

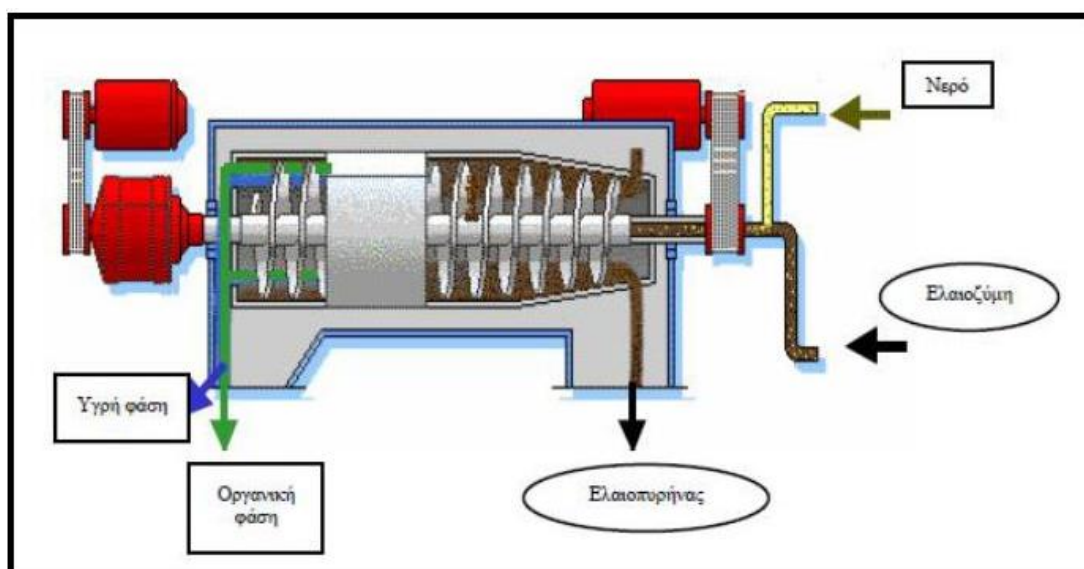


**Εικόνα 1.1:** Περιοχές που παράγουν ελαιόλαδο στη λεκάνη της Μεσογείου. Σκιασμένες περιοχές: υψηλή παραγωγικότητα, διάστικτες περιοχές: χαμηλή παραγωγικότητα. (Νιαουνάκης and Χαλβαδάκης, 2006)

Στην βιομηχανία της ελαιουργείας κύριο προϊόν της επεξεργασίας του ελαιοκάρπου αποτελεί το ελαιόλαδο. Παράλληλα με την παραγωγή του ελαιόλαδου παράγεται και μία σειρά παραπροϊόντων. Αυτά είναι ο ελαιοπυρήνας, που αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά του καρπού (κυρίως του κουκουτσιού), τα ελαιόφυλλα που έχουν μεταφερθεί με τον ελαιοκάρπο και μια σημαντική σε όγκο και οργανικό

φορτίο ποσότητα υγρών απόβλητων, που είναι γνωστά ως λιόζουμα, απόνερα, η αλλιώς κατσίγαρος. Παρότι δεν έχουν εμπορική αξία, είναι πλούσια σε σημαντικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, σάκχαρα, υπολείμματα λαδιού, φαινολικές ενώσεις, χρωστικές και χλωροφύλλες.

Τα υγρά απόβλητα ελαιотριβείου (ΥΑΕ) κατά κύριο λόγο παράγονται από τα φυγοκεντρικά ελαιотριβεία τριών φάσεων. Η πλειονότητα των ελαιотριβείων που λειτουργούν στην Ελλάδα είναι τέτοιου τύπου. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ουσία στην διαφορά ειδικού βάρους του νερού από αυτή του λαδιού. Οι αλεσμένες ελιές τοποθετούνται σε ένα τριφασικό ελαιουργικό συγκρότημα που αποτελείται από μια σειρά φυγοκεντρικών διαχωριστών οριζόντιου άξονα (decanter), όπου διαχωρίζονται τα διάφορα κλάσματα (Εικόνα 1.2). Η παραγωγική ικανότητα των ελαιотριβείων φυγοκεντρικού τύπου εξαρτάται άμεσα από την απόδοση των οριζόντιων φυγοκεντρικών διαχωριστήρων. Έτσι ο φυγοκεντρικός διαχωριστής διαχωρίζει την ελαιοζύμη σε τρεις χωριστές φάσεις, τον ελαιοπυρήνα, το ελαιόλαδο και τα φυτικά υγρά και νερά. Είναι συνεχούς λειτουργίας (continuous flow), και η λάσπη (ελαιοπυρήνας) ωθείται συνεχώς έξω από τον ελαιοδιαχωριστή με τη βοήθεια κοχλίας μεταφοράς (Βολικάκη, 2008).



**Εικόνα 1.2:** Τριφασικός διαχωριστήρας

Για τον προσδιορισμό των ΥΑΕ στην διεθνή βιβλιογραφία χρησιμοποιούνται διάφοροι όροι όπως olive mill waste-water (OMW), olive press waste-water, olive vegetation

water, olive vegetable water (OVW) (Fiestas Ros de Ursinos and Borja-Padilla, 1992). Ακολουθεί ο πίνακας 1.1 όπου παρουσιάζεται η ορολογία που χρησιμοποιείται στις διάφορες χώρες για την περιγραφή των υγρών απόβλητων ελαιοτριβείου.

**Πίνακας 1.1:** Ορολογία Υγρών Απόβλητων Ελαιοτριβείου

<b>Παραδοσιακή ή κλασσική μέθοδος</b>	<b>Φυγοκεντρική τριών φάσεων</b>	<b>Φυγοκεντρική δύο φάσεων</b>
acqua di vegetazione/ Ιταλικά	acqua di vegetazione/ Ιταλικά	água residual de 2 fases/ Πορτογαλικά
água ruça/ Πορτογαλικά	água ruça de 3 fases/ Πορτογαλικά	alrechín -2/ Ισπανικά
alrechín/ Ισπανικά	alrechín / Ισπανικά	margine-2/ Γαλλικά
amorca/ Ισπανικά	amorca/ Ισπανικά	jamilá-2/ Ιταλικά
amorgi (αμόργη)/ Αρχαία Ελληνικά	kara su/ Τούρκικα	mrag/ Μαλτέζικα
amurca/ Λατινικά	katsigaros(κατσίγαρος)/ Ελληνικά	
mounga (μούργα)/ Ελληνικά	liozumia (λιοζούμια)/ Ελληνικά	
kara su/ Τούρκικα	margine/ Γαλλικά	
katsigaros(κατσίγαρος)/ Ελληνικά	morga/ Ισπανικά	
liozumia (λιοζούμια)/ Ελληνικά	mrag/ Μαλτέζικα	
margine/ Γαλλικά	murga/ Ισπανικά	
morga/ Ισπανικά	veget abilna voda/ Κροάτικα	
mrag/ Μαλτέζικα	zubar/ Αραβικά	
murga/ Ισπανικά		
olive lees/ Αγγλικά		
veget abilna voda/ Κροάτικα		
vegetable water/ Αγγλικά		
olive mill wastewater/ Αγγλικά		

Δεν είναι εύκολο να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι ποσότητες και η σύσταση των υγρών απόβλητων σε ένα ελαιοτριβείο. Ενδεικτικά οι σημαντικότεροι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται ο όγκος των παραγόμενων ΥΑΕ είναι οι εξής:

- Την ποικιλία από την οποία προέρχεται ο ελαιόκαρπος και τον χρόνο εναπόθήκευσης πριν την ελαιοποίηση.
- Τον χρόνο διαχωρισμού του ελαιόλαδου από την ελαιοζύμη.
- Το διαθέσιμο νερό στο ελαιοτριβείο, καθώς και το κόστος προμήθειάς του.

- Την μέθοδο παραλαβής του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη, με τη κλασική μέθοδο του υδραυλικού πιεστηρίου, με την μέθοδοφυγοκέντρισης τριών φάσεων ή με την φυγοκέντριση δύο φάσεων.
- Τον χρόνο συγκομιδής και το στάδιο ωριμότητας .
- Το κλίμα και τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε περιοχή.
- Τη χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων (Κυριακόπουλος, 2005).

Στα φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία τριών φάσεων, ανά 100kg ελαιοκάρπου παράγονται περίπου 20kg ελαιόλαδο, 4kg ελαιόφυλλα, 40kg ελαιοπυρήνα και περίπου 100kg υγρών απόβλητων(ΥΑΕ) που προκύπτουν από την πρόσθεση νερού για την εκχύλιση του ελαιολάδου από τη ζύμη.

Μια θετική προσέγγιση επίλυσης του προβλήματος διάθεσης των τεράστιων όγκων ΥΑΕ ήταν η εισαγωγή στη βιομηχανία επεξεργασίας ελαιόκαρπου των φυγοκεντρικών συγκροτημάτων δύο φάσεων. Τα συγκεκριμένα λειτουργούν χωρίς προηγούμενη αραίωση της ελαιοζύμης με νερό και διαχωρίζουν τελικά δυο προϊόντα, ελαιόλαδο και ελαιοπυρήνα εμποτισμένη με το σύνολο των φυτικών υγρών του καρπού.

Η δεκαετής και πλέον εμπειρία που έχει μέχρι τώρα συσσωρευτεί από τη χρήση των φυγοκεντρικών δυο φάσεων στην Ισπανία, καταδεικνύει τη δυσκολία εφαρμογής της μεθόδου αυτής στην Ελληνική πραγματικότητα.

Ο κυριότεροι λόγοι είναι:

- Το πολύ υψηλό κόστος εγκατάστασης μονάδων επεξεργασίας του ελαιοπυρήνα δύο φάσεων.
- Η ποιότητα του ελαιολάδου *repasso*, που θα παράγεται στις μονάδες 2ης φυγοκέντρισης.
- Ο τρόπος διαχείρισης του τελικού αποβλήτου (πούλπα).
- Η γενικότερη επίλυση θεμάτων που σχετίζονται με το συντονισμό των ενεργειών συλλογής του αποβλήτου από το πλήθος ελαιοτριβείων μικρής δυναμικότητας που υπάρχουν διασκορπισμένα στη χώρα μας.

Ελαιοτριβεία με διφασικά *decanters* δεν παράγουν ξεχωριστή φάση με υγρά απόβλητα. Ουσιαστικά τα υγρά απόβλητα ευρίσκονται στον πυρήνα υψηλής υγρασίας, τον οποίο

πολλά πυρηνελαιουργεία δεν παραλαμβάνουν (διότι δεν έχουν εγκαταστήσει τα ειδικά συστήματα προεπεξεργασίας που απαιτούνται). Σε αυτή την περίπτωση έχουμε μεταφορά του προβλήματος από τα ελαιοτριβεία στα πυρηνελαιουργεία.

### 1.1.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγρών απόβλητων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) και σύστασή τους

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου γενικά εμφανίζουν σκούρο χρώμα (απόχρωσης από κίτρινο-πράσινο έως καφέ-μαύρο), είναι θολά με χαρακτηριστική έντονη οσμή που οφείλεται σε πτητικά οξέα. Το pH τους είναι όξινο περίπου 5, έχουν υψηλή επιφανειακή τάση και ρυθμιστική ικανότητα IC, ενώ ακόμα είναι πλούσια σε ανόργανα και οργανικά υδατοδιαλυτά συστατικά (Μπαλατσούρας, 1997) και φαινόλες. Στον πίνακα 1.2 που ακολουθεί απεικονίζονται τα κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ΥΑΕ.

**Πίνακας 1.2:** Κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ΥΑΕ (Fiestas Ros de Ursinos and Borja-Padilla, 1992; Hamdi and Ellouz, 1992)

Παράμετρος	Όρια τιμών
Νερό %	83-94
Οργανικά συστατικά %	4-16
Ανόργανα συστατικά %	1-2
Πυκνότητα (g/cm <sup>3</sup> )	1,024
Αγωγιμότητα (μS/cm)	80.000-160.000
pH	4,5-6,5
Βιολογικά απαιτούμενα οξυγόνο (BOD <sub>5</sub> ) mg/L	14.000-110.0000
Χημικά απαιτούμενα οξυγόνο (COD) mg/L	41.400-130.000

Οι διάφορες μελέτες που έχουν γίνει σε δείγματα διαφορετικών περιοχών και συνθήκες λειτουργίας συμφωνούν στα γενικά χαρακτηριστικά ενώ παρατηρούνται και ορισμένες μικρότερες διαφορές στα ποσοτικά αποτελέσματα. Σε αυτές συνεπικουρούν οι



διαφορετικοί τρόποι επεξεργασίας του ελαιοκάρπου (π.χ. κλασικό ή φυγοκεντρικό ελαιουργείο), η ποικιλία της ελιάς, οι κλιματολογικές συνθήκες, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, η χρήση παρασιτοκτόνων και λιπασμάτων, ο τρόπος συγκομιδής και απόθήκευσης του (Cabrerá et al., 1996).

Τα ανόργανα συστατικά που περιέχονται συχνότερα στα ΥΑΕ είναι το κάλιο ( $K^{++}$ ), το νάτριο ( $Na^{+}$ ), το ασβέστιο ( $Ca^{++}$ ) και τα φωσφορικά ( $PO_4^{2-}$ ) με συγκέντρωσεις 15,3, 5,4, 1,2 και 0,8 g/L αντίστοιχα (S'habou et al., 2008). Αυτά μαζί με πολλά άλλα ιχνοστοιχεία παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης λιπαντικής τους αξίας.

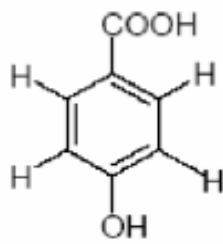
**Πίνακας 1.3:** Κύρια συστατικά των ΥΑΕ (Zevrakis and Ballis, 1996)

Συστατικό	Συγκέντρωση(%)	Κύρια συστατικά
Νερό	83-92	
Λίπη	0,03-1,00	Υπολείμματα ελαίου
Αζωτούχες ουσίες	1,2-2,4	Γλουταμίνη, Γλυκίνη, Αργινίνη, Ιστιδίνη, Προλίνη, Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη, Λυσίνη, Μεθειονίνη, Γλυκοζαμίνη κ.ά.
Σάκχαρα	2,0-8,0	Ραφινόζη, Μανόζη, Σακχαρόζη, Γλυκόζη, Αραβινόζη, Ραμνόζη, Γαλακτόζη, Ξυλόζη
Οργανικά οξέα	0,5-1,5	Οξικό, Ηλεκτρικό, Κιτρικό, Γλυκερικό, Γαλακτικό, Μηλικό, Μηλονικό, Οξαλικό, Τρυγικό, Φουμαρικό,
Πολυαλκοόλες	0,5-1,5	Γλυκερίνη, Μανιτόλη
Πηκτίνες, Ταννίνες	0,4-1,5	Πηκτίνες, Ταννίνες
Φαινολικές ενώσεις	0,3-0,8	<i>Φλαβονοειδή:</i> Απεγνίνη, Λουτεολίνη, Κερσετίνη, Λουτεολίνη. <i>Φαινόλες:</i> Καφεϊκό, Κιναμικό, 2,6-διυδροξυβενζοϊκό, π-υδροξυβενζοϊκό, Συριγγικό, Φερουλικό, π-κουμαρικό, Βανιλικό, Βερατρικό, Πρωτοκατεχικό, Υδροξυτυροσολή, Τυροσολή, Πυροκατεχικό.
Ανόργανα συστατικά	0,4-1,5	Ελαιοευρωπαϊνή K, P, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Cl, S

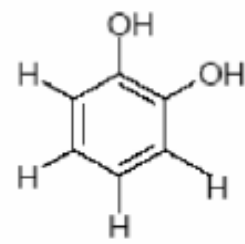
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φαινολικές ενώσεις στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου. Πρόκειται για αντιοξειδωτικές ουσίες που προστατεύουν το ελαιόλαδο από οξείδωση των λιπαρών του οξέων και συμβάλλουν στην καλύτερη διατήρηση του (Tsimidou et al., 1992). Στις φαινολικές αυτές ουσίες απόδίδεται το σκοτεινό χρώμα

των ΥΑΕ αλλά και η φυτοτοξικότητά και η ρυπαντική τους δράση εν γένει η οποία έχει σημαντικότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Aggelis et al., 2003; D' Annibale et al., 2006; Ergul et al., 2011; Kornaros, 2006; Sayadi and Ellouz, 1992).

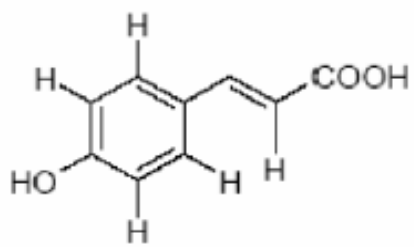
Οι φαινολικές ενώσεις είναι ουσίες που αποτελούνται από ένα βενζολικό δακτύλιο ο οποίος περιέχει μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Στο δέντρο της ελιάς αυτές συναντούνται στα φύλλα και στον ελαιόκαρπο και χαρακτηρίζονται ως πολυφαινόλες. Η ποσότητα αυτών στον ελαιόκαρπο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το βαθμό ωρίμανσης, την ποικιλία, τις κλιματικές συνθήκες και τον τρόπο καλλιέργειας, τον τρόπο εξαγωγής του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο (Yorulmaz et al., 2012). Στο ελαιόλαδο η ποσότητα των πολυφαινολών κυμαίνεται από 40 έως 1.000 μg/g ελαίου και αποτελεί μόνο το 1-2% της ποσότητας των συνολικών αντιοξειδωτικών στο ελαιόλαδο. Στα ΥΑΕ μεταφέρεται η υπόλοιπη ποσότητα (περίπου 53%) ή βρίσκεται στην ελαιοπυρήνα (περίπου 45%) (Πετρωτός, 2009). Στο ελαιόλαδο οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις είναι η τυροσόλη και η υδρόξυτυροσόλη. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις απαντούνται και ελαιοευρωπαΐνη, καφεϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, o-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, σιναπικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, γεντιστικό οξύ, το σικιμικό οξύ, p-φαινυλοξικό, οι ενώσεις θυμόλη, καρβακρόλη και οι φλαβονοειδείς ενώσεις καμφερόλη, απιγενίνη και κερκετίνη. Στον κατσίγαρο οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν και φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες και φλαβονοειδή και απεικονίζονται στην εικόνα 1.3.



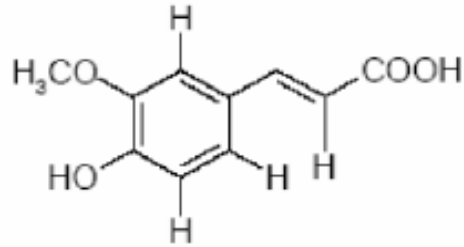
1. p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ



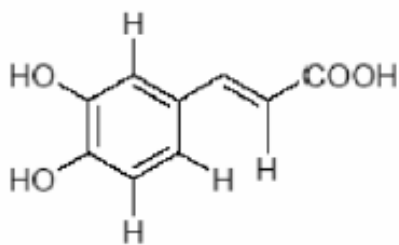
2. Βενζυλκατεχόλη



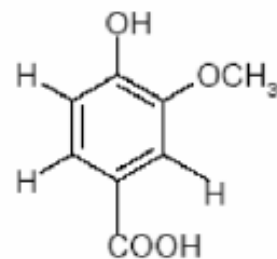
3. p-Κουμαρικό οξύ



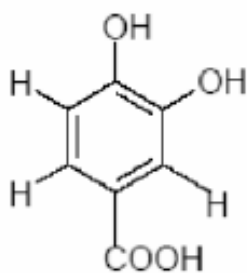
4. Φερουλικό οξύ



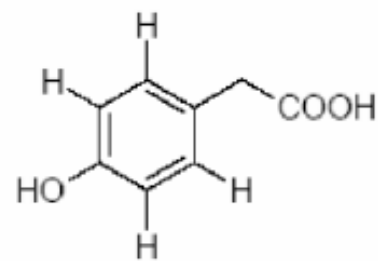
5. Καφεϊκό οξύ



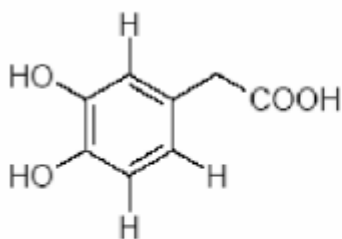
6. Βανιλικό οξύ



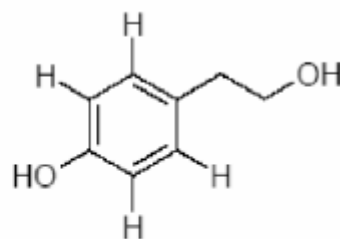
7. Πρωτοκατεχικό οξύ



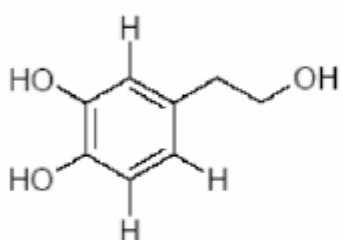
8. p-Υδροξυφαινολικό οξύ



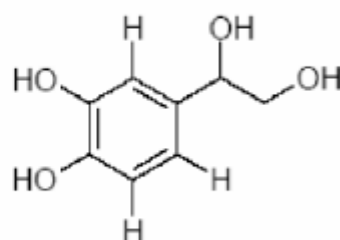
9. Ομοπρωτοκατεχικό οξύ



10. Τυροσόλη



11. Υδροξυτυροσόλη



12. 3,4-Διυδροξυφαιτυλαιθανόλη

**Εικόνα 1.3:** Φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον κασίγαρο (Knurr et al., 1996).

Τα υγρά απόβλητα ελαιολιτριβείου αποτελούν ένα σύνθετο οργανικό υλικό στο οποίο υπάρχει πέραν των διαφόρων μακρο- και μικροστοιχείων και μία πλούσια μικροχλωρίδα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα ανάπτυξης μικροοργανισμών. Αυτή η μικροχλωρίδα είναι της τάξης των  $10^5$  c.f.u./ml (Niaounakis et al., 2004). Η ιδιάζουσα σύσταση των ΥΑΕ παρόλα αυτά κάνει δύσκολη την ανάπτυξη αρκετών μικροοργανισμών και περιορίζει το φάσμα του μικροβιακού πληθυσμού αφού η παρουσία φαινολικών ουσιών σε αυτά εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση.

### 1.1.3 Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ουσιών στα ΥΑΕ

Οι φαινολικές ουσίες που υπάρχουν στον κασίγαρο και στο ελαιόλαδο έχουν αντιοξειδωτική δράση. Αποτελούν μια μεγάλη και ανεκμετάλλευτη σε μεγάλο βαθμό πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών εάν συνυπολογίσουμε τις τεράστιες ποσότητες αποβλήτων που παράγονται και χρήζουν διαχείρισης. Ενδεικτικά σε ένα λίτρο απόβλητων υπολογίζεται ότι περιέχονται περίπου 130 mg υδροξυτυροσόλης. Η υδροξυτυροσόλη (3,4-διυδροξυ-φαιτυλαιθανόλη) όπως και η τυροσόλη που

απαντούνται στα ΥΑΕ είναι ουσίες δομικά όμοιες με φαρμακευτικές αντιοξειδωτικές και φυτοτοξικές ιδιότητες (Visioli et al., 1999). Έχουν θετική επίδραση σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις, σε δερματικές ασθένειες και από διάφορες έρευνες διαπιστώνεται ότι μπορούν να μειώσουν τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση καρκινικών κυττάρων σε κάποιες περιπτώσεις καρκίνου (Bulotta et al., 2014). Σε μικρότερο βαθμό στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου μπορεί να βρεθεί και η ελαιουρωπαΐνη. Η συγκέντρωση της είναι μικρή καθώς κατά την παραγωγική διαδικασία υδρολύεται σε υδροξυτυροσόλη και ελενολικό οξύ.

#### **1.1.4 Περιβαλλοντικά προβλήματα από την ανεξέλεγκτη διάθεση των απόβλητων ελαιουργείων**

Η υψηλή συγκέντρωση οργανικών ουσιών και ο αργός ρυθμός απόδομησης των φαινολικών ουσιών έχουν υψηλό περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Σημαντικό ρόλο επίσης στην περιβαλλοντική δράση των απόβλητων διαδραματίζει το ιδιαίτερα χαμηλό pH, η υψηλή συγκέντρωση στερεών και η ιδιαίτερα κακή οσμή τους. Έχει υπολογιστεί πως 1 m<sup>3</sup> κατσίγαρου ισοδυναμεί με 100 – 200 m<sup>3</sup> οικιακών λυμάτων. Από έναν τόνο επεξεργάσιμου ελαιοκάρπου παράγονται μόλις 200 kg ελαιολάδου και ταυτόχρονα 400-1200 λίτρα υγρά απόβλητα και 400-800 κιλά στερεά απόβλητα (ανάλογα τη μέθοδο που χρησιμοποιείται), οπότε γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η ρύπανση που προκαλείται από τα ελαιουργεία, είναι ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα που απασχολούν τις χώρες της Μεσογείου.

Υπολογίζεται ότι παράγονται περίπου 7 έως 30 εκατομμύρια κυβικά μέτρα ΥΑΕ ανά έτος παγκοσμίως (Tsagaraki et al., 2007). Στην Ελλάδα, η παραγωγή τους αγγίζει το 1.5 εκατομμύριο τόνους ανά έτος (Israilides et al., 1997) με το μεγαλύτερο μέρος της ποσότητας αυτής να παράγεται σε μικρό χρονικό διάστημα από το Νοέμβριο έως και τον Φεβρουάριο που είναι η περίοδος συγκομιδής και επεξεργασίας του ελαιοκάρπου. Στην Ελλάδα το μεγαλύτερο μέρος των υγρών αποβλήτων διατίθεται παράνομα απευθείας σε υδάτινους αποδέκτες, δηλαδή σε λίμνες, ποταμούς, ακόμα και απευθείας στη θάλασσα, χωρίς το απόβλητο να πληροί τις απαραίτητες προϋποθέσεις διάθεσης στα σώματα αυτά (Tsagaraki et al., 2007). Σε άλλες μεσογειακές χώρες όπως στην Ιταλία και εκεί το μεγαλύτερο ποσοστό διατίθεται στο έδαφος (95%) ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό μόνο επεξεργάζεται σε δεξαμενές εξάτμισης. Στην Ελλάδα τα

προβλήματα διαχείρισης των απόβλητων των ελαιοτριβείων οφείλονται κατά κύριο λόγο στην αυξημένη παραγωγή ελαιολάδου άρα και παραγόμενων αποβλήτων. Επιπλέον, τα περισσότερα ελαιοτριβεία είναι τριφασικά και παράγουν μεγάλες ποσότητες απόβλητων που λόγω ανεπάρκειας εγκαταστάσεων διαχείρισης αποβλήτων καταλήγουν να εκχύνονται αρκετές φορές, μέχρι και σήμερα, σε κοντινούς υδάτινους αποδέκτες όπως ρεματιές, ποτάμια, λίμνες και θάλασσες. Στις περιπτώσεις αυτές δημιουργούνται τεράστια προβλήματα μόλυνσης των υπογείων υδάτων λόγω της τοξικότητας των απόβλητων, καθώς και μία γενικότερη υποβάθμιση του περιβάλλοντος γύρω από τα ελαιοτριβεία.

Σε αντίθεση με τα επικρατέστερα φυγοκεντρικά συστήματα τριών φάσεων, τα φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία δυο φάσεων παράγουν μικρές ποσότητες ΥΑΕ. Σε αυτήν τη διαδικασία δεν προστίθεται επιπλέον νερό στην ελαιοζύμη. Κατά την επεξεργασία 1000 Kg καρπού παράγονται 800 περίπου Kg αποβλήτων. Αναφέρεται από τον Μπαλατσούρα (1997) ότι τα συστήματα αυτά, για κάθε κιλό ελαιολάδου, δίνουν 1-1,25 kg ΥΑΕ.. Τα στάδια επεξεργασίας σε αυτού του τύπου τα ελαιοτριβεία είναι συνοπτικά: παραλαβή ελαιοκάρπου, τροφοδοσία, αποφύλλωση και πλύσιμο. Ακολουθεί σπάσιμο-άλεση του ελαιοκάρπου και μάλαξη, προκειμένου η ελαιοζύμη να μετατραπεί σε ομογενή πούλπα. Η παραγωγή του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη γίνεται με φυγοκέντρωση. Πρέπει να αναφερθεί όμως, ότι το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δύσκολη διαχείριση των στερεών αποβλήτων που προκύπτουν, λόγω του υψηλού ποσοστού υγρασίας. Επιπλέον, ξηραίνεται με αργό ρυθμό και έχει υψηλό ρυπαντικό φορτίο.

Η μεγάλη τιμή του χημικά και βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD έως και 220g/L, αναλογία COD/BOD<sub>5</sub> από 2,5 έως και 5) που έχουν τα ΥΑΕ καθιστούν εξαιρετικά δύσκολη την απόικοδόμηση των ΥΑΕ. Λόγω του πλούσιου περιεχομένου τους σε φαινολικά συστατικά, τα ΥΑΕ παρουσιάζουν έντονη φυτοτοξικότητα στα μέρη διάθεσης τους στο έδαφος, καθώς εμποδίζεται η βλάστηση, η ανάπτυξη των φυτών, ενώ ακόμα προκαλείται και πτώση των φύλλων και των καρπών. Όταν καταλήγουν στο νερό δημιουργούν μία ελαιώδη κρούστα, αδιαπέραστη από τον αέρα και το φώς που μειώνει το διαλυμένο οξυγόνο στο νερό. Αποτέλεσμα αυτού είναι η μείωση του αριθμού διαφόρων ζωντανών οργανισμών στο νερό και κατά συνέπεια η διατάραξη ολόκληρης της ισορροπίας του οικοσυστήματος (Kapellakis et al, 2006). Η υψηλή

συγκέντρωση φωσφόρου στον κατσίγαρο που καταλήγει στο νερό, προκαλεί έντονη ανάπτυξη φυκών και δημιουργεί φαινόμενα ευτροφισμού. Σε αντίθεση με τον άνθρακα και το άζωτο που μετά την αποικοδόμησή τους μετατρέπονται σε διοξείδιο του άνθρακα και αέριο άζωτο, ο φώσφορος δεν μπορεί να αποικοδομηθεί πλήρως, παρά μόνο ένα μικρό ποσοστό του μέσω της τροφικής αλυσίδας (Niaounakis and Halvadakis, 2004; Chtourou et al., 2004). Μεγάλο πρόβλημα επίσης είναι η αλλοίωση του χρώματος των υδάτων, φαινόμενο που αποδίδεται στην οξείδωση και τον πολυμερισμό των ταννινών που δίνουν σκουρόχρωμες πολυφαινόλες.



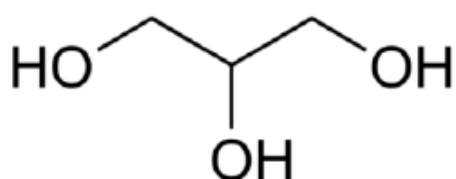
**Εικόνα 1.4:** Μικρό ποτάμι στην περιοχή της Μεσσηνίας με έντονη ρύπανση από κατσίγαρο (διαδίκτυο)

Σε μεγαλύτερη χρονική κλίμακα τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων που ρυπαίνουν το έδαφος μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα διήθησης του εδάφους και να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις και στο υπόγειο νερό (Zenjari and Nejmeddine, 2001) ιδιαίτερα την περίοδο αιχμής που λειτουργούν τα ελαιοτριβεία και υπάρχει υψηλό φορτίο ρύπανσης του εδάφους με ΥΑΕ.

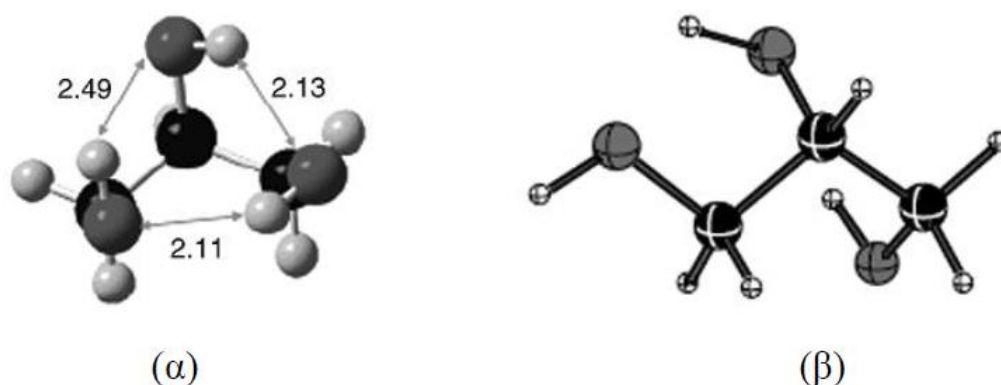
## 1.2 Γλυκερόλη

### 1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά γλυκερόλης

Η γλυκερόλη ή γλυκερίνη αποτελεί την εμπειρική ονομασία της χημικής οργανικής ένωσης 1,2,3-προπανοτριόλης, μιας τριθενούς αλκοόλης με χημικό τύπο  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ . Ο συντακτικός και στερεοχημικός της τύπος φαίνονται στις εικόνες 1.5 και 1.6 αντίστοιχα.



**Εικόνα 1.5:** Συντακτικός τύπος γλυκερόλης



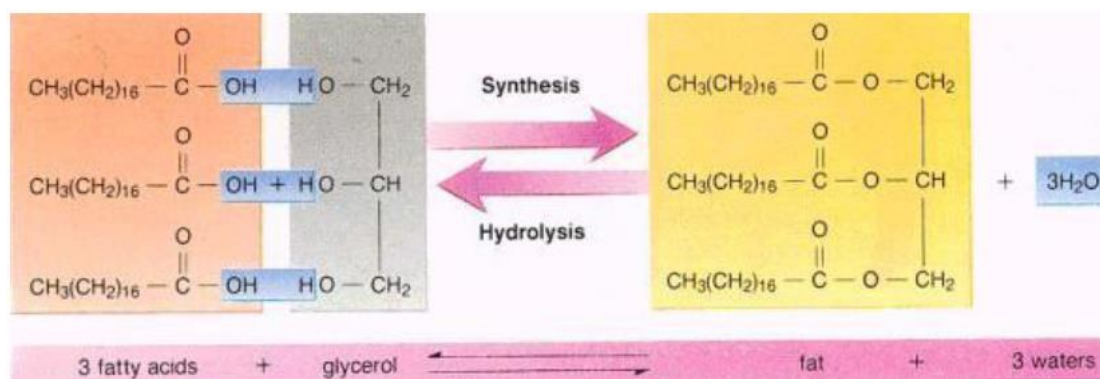
**Εικόνα 1.6:** Διάταξη του μορίου της γλυκερόλης στην αέρια (α) και στην υγρή (β) φάση αντίστοιχα (Callam et al., 2001)

Η γλυκερόλη περιέχει στο μόριο της τρεις υδροξυλομάδες, στις οποίες οφείλει την υδατοδιαλυτή της ικανότητα και την υδρόφιλη φύση της (Rahmat et al., 2010). Με τον όρο γλυκερίνη αναφέρονται περισσότερο τα εμπορικά παρασκευάσματα της γλυκερόλης σε νερό, όπου η συγκέντρωση της καθαρής γλυκερόλης υπερβαίνει το 95%. Σε κανονικές συνθήκες είναι ημίρρευστη, διαυγής, άχρωμη, σχεδόν άοσμη, με γλυκιά γεύση από όπου και πήρε την ονομασία της, όταν ανακαλύφθηκε το 1779 από τον σουηδό χημικό Carl W. Scheele. Το ειδικό της βάρος είναι περίπου 1,26 g/mL, το μοριακό της βάρος είναι 92 g/mol, έχει σημείο τήξης τους 17,8°C και σημείο βρασμού τους 290 °C, ενώ σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 17 °C, βρίσκεται σε κατάσταση



ιξώδους μορφής (πυκνόρρευστη) (CRC Handbook of Chemistry and Physics, 87th edn., Boca Raton (FL): 2006.). Η τρισθενής αυτή αλκοόλη μπορεί να μετατραπεί σε γλυκερόζη υπό την επίδραση ήπιων οξειδωτικών μέσων ενώ υπό την επίδραση ισχυρών οξειδωτικών μέσων μετατρέπεται σε γλυκερινικό οξύ. Όταν θερμαίνεται παρουσία  $\text{KHSO}_4$ , σχηματίζει μία ακόρεστη αλδεΐδη την ακρολεΐνη (Paglaro et al., 2008). Στο νερό και στις αλκοόλες είναι διαλυτή ενώ είναι ελαφρά διαλυτή στους περισσότερους κοινούς διαλύτες όπως αιθέρα και δεν διαλύεται στους υδρογονάνθρακες. Η γλυκερίνη παρέχει εστέρες, ή αλλιώς γλυκερίδια, από τα οποία σημαντικότερα είναι τα λιπίδια που σχηματίζονται με τα λιπαρά οξέα.

Παραδοσιακά, η γλυκερόλη παράγεται βιομηχανικά μέσω της διαδικασίας της σαπωνοποίησης δηλαδή την αντίδραση υδρόλυσης των λιπών και των ελαίων, κατά την οποία τα τριγλυκερίδια διασπώνται παρουσία αλκαλικών υλών στα συστατικά τους, τα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.7. Η προκύπτουσα ακατέργαστη γλυκερόλη υποβάλλεται σε καθαρισμό και στη συνέχεια σε απόσταξη, για να περιοριστεί η περιεκτικότητα σε νερό μέχρι ποσοστού 3%, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά ή βιομηχανικά προϊόντα (Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012).



**Εικόνα 1.7:** Η γλυκερόλη ως δομικό στοιχείο των τριγλυκεριδίων.

Η αντίδραση της σαπωνοποίησης είναι γνωστή από το 2800 π.Χ. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο η αντικατάσταση των σαπώνων από μη σαπωνοειδή απορρυπαντικά έχει μειώσει αρκετά την παραγωγή γλυκερόλης σε παγκόσμια κλίμακα. Με την αλματώδη ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας τις επόμενες δεκαετίες, επιτυγχάνεται παραγωγή της γλυκερόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων, με πιο γνωστή την χρήση της ζύμης *Saccharomyces cerevisie* κατά την τέλεση της αλκοολικής ζύμωσης και συγκεκριμένα

κατά τον σχηματισμό δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης μέσω της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης. Τα τελευταία χρόνια η πλειονότητα της παγκόσμιας παραγωγής γλυκερόλης προέρχεται από ελαιοχημικές δραστηριότητες, από την βιομηχανία ποτών, την καλλιέργεια του φύκου *Dunalliella* και κυρίως από την παραγωγή βιοντήζελ, με την γλυκερόλη να αποτελεί παραπροϊόν σε ποσοστό περίπου 10%.

Η γλυκερόλη συνήθως αξιοποιείται από τους βιομηχανικούς τομείς των φαρμάκων, των τροφίμων, των καλλυντικών, κ.α. Είναι τόσο ευρύ το φάσμα χρήσης της γλυκερίνης που έχει πάνω από 1500 γνωστές χρήσεις, μεταξύ των οποίων ως διαλύτης, μέσο διαβροχής, πλαστικοποιητής, θρεπτικό συστατικό σε ζυμοτεχνικές βιομηχανίες καθώς και ως πρώτη ύλη στην παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών, σαπώνων, βερνικιών, εκρηκτικών υλών (νιτρογλυκερίνη), στο ηλεκτρονικό τσιγάρο ως υγρό-βάση που χρησιμοποιείται για την αναπλήρωση των φίλτρων, στην οποία προστίθενται αρώματα και νικοτίνη. Στους διαβητικούς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο της ζάχαρης, ή με τη μορφή υποθέτου ως καθαρτικό. Χρησιμοποιείται ακόμα και στην θεατρική και κινηματογραφική σκηνοθεσία ως «τρικ» αντικαθιστώντας τα πραγματικά δάκρυα. Γενικά η γλυκερόλη μπορεί να αποτελεί υλικό εκκίνησης για την δημιουργία νέων προϊόντων (Pagliaro et al., 2007) μέσω χημικών μετατροπών. Με οξείδωση ή αναγωγή της γλυκερόλης παράγονται προϊόντα με τρία άτομα άνθρακα όπως είναι η δι-υδροξυακετόνη, το γαλακτικό οξύ, το πυροσταφυλικό οξύ, η προπανόλη, η ισοπροπανόλη, η ακετόνη, η ακρολεΐνη, η προπιοναλδεΐδη και το υδροξυ-πυροσταφυλικό (Claude, 1999; da Silva et al., 2009; Rahmat et al., 2010). Επίσης με την αντίδραση της γλυκερόλης με άλλα μόρια μπορούν να παραχθούν νέα προϊόντα. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η κατεργασία της γλυκερόλης παρουσία διοξειδίου του άνθρακα για την παραγωγή ανθρακικής γλυκερόλης (glycerol carbonate) (Pagliaro et al., 2007; Rahmat et al., 2010). Τέλος, η γλυκερόλη είναι εξαιρετικά σταθερή υπό κανονικές συνθήκες απόθήκευσης, συμβατή με πολλές άλλες χημικές ουσίες και σχεδόν μη ερεθιστική σε διάφορες χρήσεις της ( Pagliaro et al., 2007).



**Εικόνα 1.8:** Χρήσεις της γλυκερόλης

### 1.2.2 Κλιματική αλλαγή και ανάγκη χρήσης των βιοκαυσίμων

Σημαντικότερη επίδραση στο περιβάλλον έχει η αλόγιστη χρήση ορυκτών πόρων για την δημιουργία καυσίμων. Απόρροια αυτού, αποτελεί το φαινόμενο του «θερμοκηπίου», κατά το οποίο η υπερβολική έκλυση αέριων ρύπων, κυρίως CO<sub>2</sub>, οδηγεί στην αύξηση της παγκόσμιας θερμοκρασίας. Σήμερα, οι συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα καθώς και άλλων αέριων στην ατμόσφαιρα είναι οι υψηλότερες των 650.000 τελευταίων ετών και συντελούν στην παγίδευση της ηλιακής ακτινοβολίας. Ο πλανήτης υπερθερμαίνεται, το κλίμα αποσταθεροποιείται. Ενδεικτικά αξίζει να αναφερθεί ότι η μέση πλανητική θερμοκρασία σήμερα είναι υψηλότερη κατά 0,8 °C σε σύγκριση με τα προβιομηχανικά επίπεδα. Η παγκόσμια κοινότητα προκειμένου να βρεί λύσει στο θέμα αυτό προχώρησε στην ψήφιση του πρωτοκόλλου του Κυότο το 1995, σύμφωνα με το οποίο αποφασίστηκε από τα εκβιομηχανισμένα κράτη η μείωση της παραγωγής αέριων ρύπων κατά 5% από τα αντίστοιχα επίπεδα του 1990 για το χρονικό διάστημα από το 2008 έως το 2020. Σύμφωνα με την επιστημονική κοινότητα για να περιοστούν οι χειρότερες επιπτώσεις των κλιματικών αλλαγών, θα πρέπει να περιοριστεί η αύξηση της θερμοκρασίας σε λιγότερο από +1,5 °C σε σχέση με τα προβιομηχανικά επίπεδα.

Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί και με την χρήση των βιοκαυσίμων, αφού η χρήση αυτών συμβάλλει στην μείωση της εκπομπής επικίνδυνων αέριων ρύπων, μειώνει την οικονομική εξάρτηση κάθε χώρας από τις εισαγωγές συμβατικών ορυκτών

καυσίμων και δημιουργεί νέες ευκαιρίες για τους αγρότες, για την μεταποίηση και την βιομηχανία. Ως βιοκαύσιμα χαρακτηρίζονται όλα τα στερεά, υγρά και αέρια καύσιμα που προέρχονται από την βιομάζα δηλαδή το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα προϊόντων, καταλοίπων και απόβλητων αγροτο-βιομηχανικής προέλευσης. Η βιομάζα είναι ανανεώσιμη πηγή ενέργειας, αφού ανανεώνεται συνεχώς λόγω φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυτικών οργανισμών. Τα βιοκαύσιμα είναι βιοαποικοδομήσιμα, δεν περιέχουν αρωματικές ενώσεις και οι εκπομπές αέριων ρύπων όπως οξειδίων του θείου, μονοξειδίου του άνθρακα, άκαυστων υδρογονανθράκων και αιθάλης, που προέρχονται από την καύση τους είναι πολύ χαμηλές. Κυριότερα βιοκαύσιμα είναι το βιοντήζελ, το βιουδρογόνο, η βιοαιθανόλη και το βιομεθάνιο.

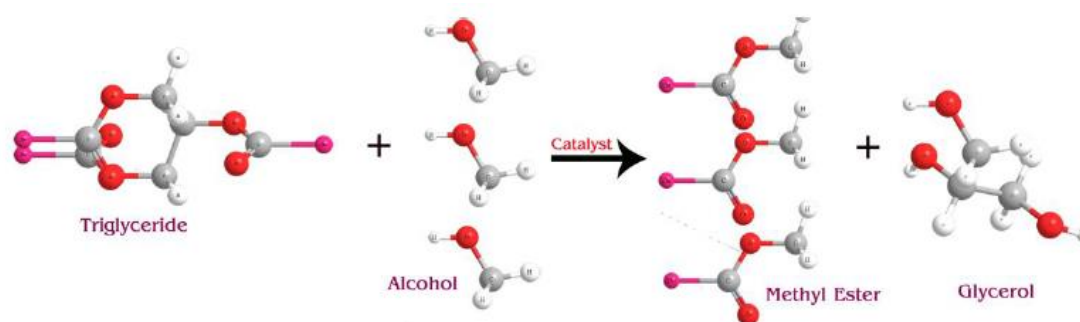
### **1.2.3 Βιοντήζελ και διεργασία παραγωγής του**

Βιοντήζελ ονομάζεται κάθε φυτικό έλαιο ή ζωικό λίπος που έχει (ή μπορεί σχετικά εύκολα να αποκτήσει) συγκρίσιμες ιδιότητες ως καύσιμο με το ντίζελ και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικής προέλευσης υποκατάστατο του τελευταίου (Bozbas 2005, Krawcz et al., 1996). Χημικά, αποτελείται (συνήθως) από μακράς αλυσίδας καρβοξυλικούς αλκυλεστέρες (RCOOR), (συνήθως) μεθυλεστέρες (RCOOCH<sub>3</sub>), αιθυλεστέρες (RCOOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ή προπυλεστέρες (RCOOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

Οι πρώτες ύλες από τις οποίες παράγεται το βιοντήζελ είναι ο ηλίανθος, η ελαιοκράμβη, διάφορα σπορέλαια όπως φοινικέλαιο, βαμβακέλαιο, σογιέλαιο και χρησιμοποιημένα έλαια από εργοστάσια τροφίμων, εστιατόρια κ.λπ. Στην Ευρώπη συνήθως χρησιμοποιείται κραμβέλαιο, ενώ στην Βραζιλία έλαιο από σπέρματα σόγιας, ηλίανθου και φοινικέλαιο (da Silva et al., 2009).

Παράγεται τυπικά μέσω της αντίδρασης μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων, που αποτελούν το κύριο συστατικό των φυτικών και των ζωικών λιπών, με κάποια αλκοόλη μικρού μοριακού βάρους (συνήθως μεθανόλη λόγω χαμηλού κόστους) ενώ παράγεται ακόμα γλυκερόλη. Σαν μετεστεροποίηση γενικά ονομάζεται η αντίδραση ενός εστέρα με μία αλκοόλη για τον σχηματισμό ενός νέου εστέρα και μιας νέας αλκοόλης, σε μία διαδικασία παρόμοια της υδρόλυσης, με την διαφορά ότι η αλκοόλη παίρνει το ρόλο του νερού. Η αλκοόλη προστίθεται σε περρίσεια για να επιτευχθούν υψηλοί βαθμοί

μετατροπής, δηλαδή υψηλή απόδοση σε βιοντίζελ. Κατά την στοιχειομετρία της αντίδρασης, για κάθε μόριο τριγλυκεριδίου χρειάζονται τρία μόρια αλκοόλης για να παραχθούν τρία μόρια εστέρων και ένα μόριο γλυκερόλης. Στην πραγματικότητα όμως χρησιμοποιείται μεγαλύτερη αναλογία αλκοόλης/ ελαίου από 3:1 με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης σε εστέρες. Για να επιταχυνθεί η αντίδραση χρησιμοποιούνται διάφοροι καταλύτες (όξινοι, αλκαλικοί και ενζυμικοί) σε θερμοκρασία είτε υψηλή είτε χαμηλή. Από τον τύπο του καταλύτη χαρακτηρίζεται και το είδος της μετεστεροποίησης, αν θα είναι δηλαδή αλκαλική λόγω της χρήσης NaOH ή KOH ή όξινη λόγω χρήσης H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Στην Εικόνα 1.9 που ακολουθεί φαίνεται η τυπική αντίδραση της όξινης ή αλκαλικής μετεστεροποίησης, σύμφωνα με την οποία τα μόρια των τριγλυκεριδίων που περιέχονται στα φυτικά έλαια αντιδρούν με την μεθανόλη, παρουσία καταλύτη, και παράγουν εστέρες (βιοντίζελ) και γλυκερόλη ως κύριο παραπροϊόν.

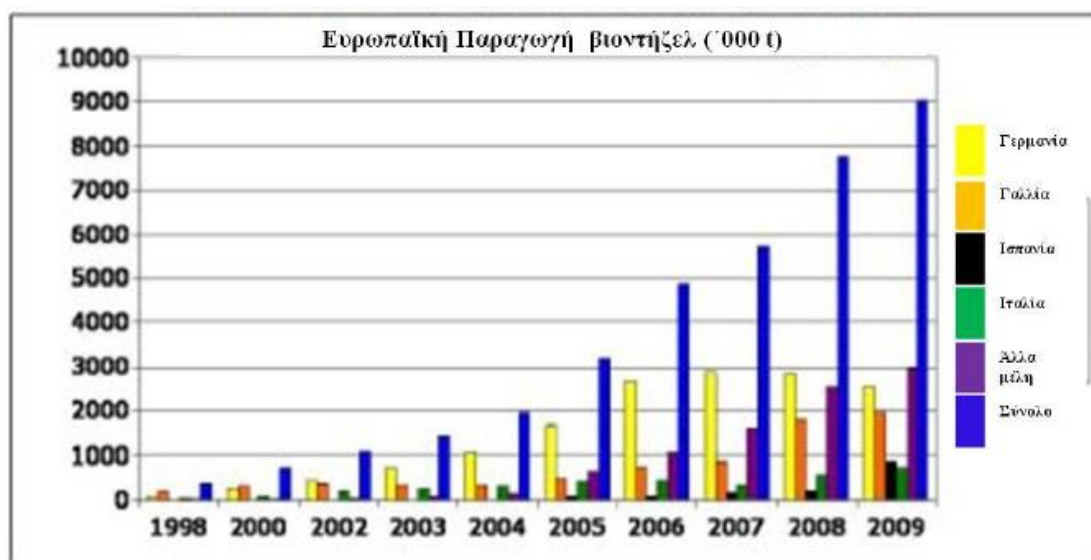


**Εικόνα 1.9:** Τυπική αντίδραση τριγλυκεριδίων με αλκοόλη για την παραγωγή μεθυλεστέρων και γλυκερόλης.

Πιο συγκεκριμένα τα στάδια παραγωγής είναι τα εξής. Αρχικά, τα έλαια υπόκεινται σε μία διαδικασία ραφινάρισματος, προκειμένου να απόμακρυνθούν από αυτά η λεκιθίνη, ο φώσφορος και τα λιπαρά οξέα, ενώ στη συνέχεια θερμαίνονται στους 55°C με περίσσεια μεθανόλης και καταλύτη. Η αντίδραση διαρκεί 2 ώρες και στην συνέχεια το μείγμα αφήνεται σε ηρεμία. Το μείγμα μεθανόλης-γλυκερόλης σαν βαρύτερο καθιζάνει στον πυθμένα, από όπου και απόμακρύνεται.

Το βιοντίζελ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο μόνο σε κινητήρες ντίζελ οι οποίοι έχουν υποστεί κατάλληλη μετατροπή, είτε σαν καύσιμο ντίζελ μόνο του είτε αναμειγμένο με πετροντίζελ σε διάφορες αναλογίες, είτε ως πετρέλαιο θέρμανσης (Van Gerpen et al., 2004). Εδώ και δύο δεκαετίες είναι γνωστή η δυνατότητα του

βιοντήζελ να αντικαταστήσει το συμβατικό ντίζελ σε κινητήρες εσωτερικής καύσης. Προτάθηκε μάλιστα σαν εναλλακτική λύση στην χρήση σκέτων φυτικών ελαίων, τα οποία τις περισσότερες φορές παρουσιάζουν χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ακάλληλα για χρήση στους κινητήρες των αυτοκινήτων. Στην Ευρώπη τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλη αύξηση στην παραγωγή του βιοντήζελ, όπως φαίνεται από τα στοιχεία που παραθέτει το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Βιοντήζελ ([www.ebb-eu.org](http://www.ebb-eu.org)). Ενδεικτικά για την δεκαετία 2000-2009, η συνολική παραγωγή από τους 800.000 tn έφτασε στους 9.000.000 tn, καταδεικνύοντας την δυναμική παρουσία του βιοντήζελ στην αγορά των καυσίμων.



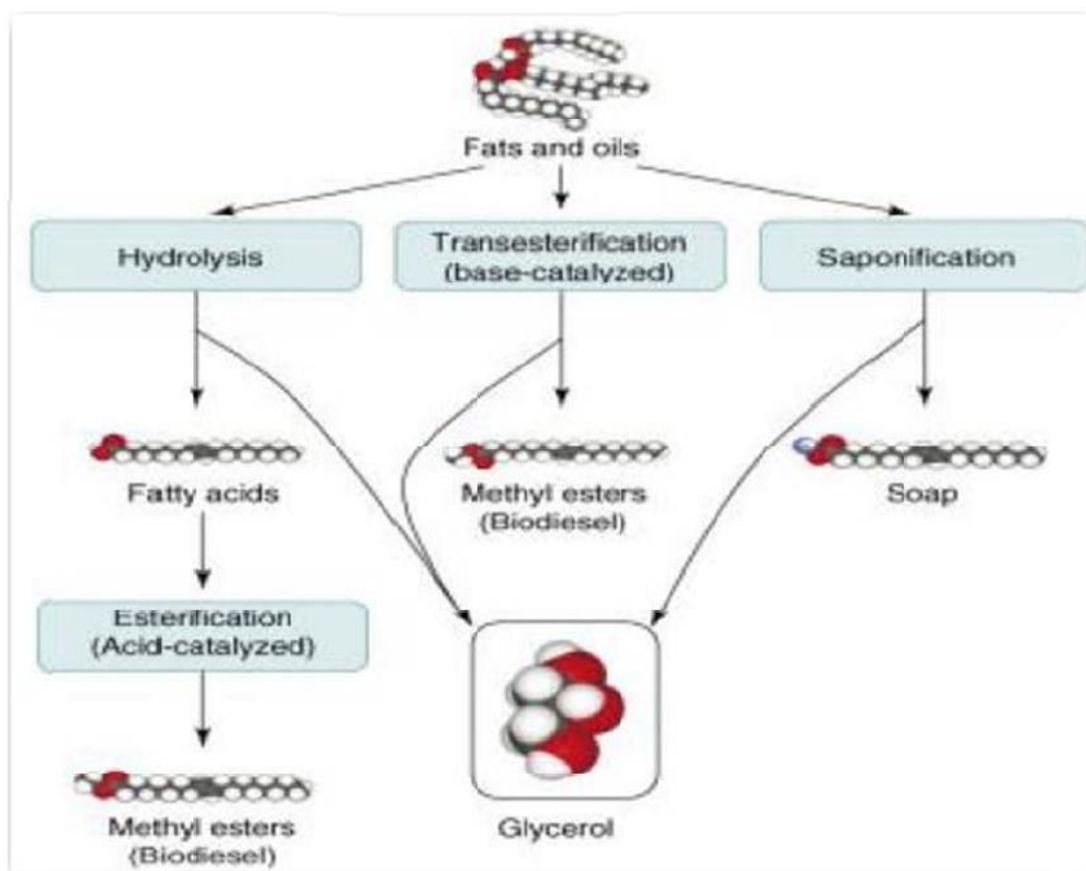
**Εικόνα 1.10:** Ετήσιες παραγωγές βιοντήζελ στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Η ανοδική αυτή τάση αύξησης της παραγωγής βιοντήζελ ενισχύεται από την επιταγή της κοινοτικής οδηγίας 2003/30/ΕΚ που προβλέπει την εισαγωγή των βιοκαυσίμων στις αγορές των κρατών μελών.

#### 1.2.4 Η γλυκερόλη ως παραπροϊόν της παραγωγής βιοντήζελ

Η γλυκερόλη αποτελεί το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής βιολογικού πετρελαίου. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί ραγδαία αύξηση στις ποσότητες ακάθαρτης γλυκερόλης ως συνέπεια της αύξησης της παραγωγής βιοντήζελ. Στην εικόνα 1.11 που ακολουθεί διακρίνονται οι οδοί με τις οποίες δημιουργείται γλυκερόλη ως παραπροϊόν

χημικής διεργασίας (Johnson & Taconi, 2007; Yazdani & Gonzalez, 2007; da Silva *et al.*, 2009; Wolfson *et al.*, 2009; Gupta & Kumar, 2012; Leoneti *et al.*, 2012).



**Εικόνα 1.11:** Σχηματισμός γλυκερόλης ως κύριο παραπροϊόν της παραγωγής βιοντήζελ (Yazdani & Gonzalez, 2007).

Η τεράστια παραγωγή γλυκερόλης έχει αντίκτυπο τόσο σε οικονομικό όσο και σε οικολογικό επίπεδο. Οι ποσότητες ακάθαρτης γλυκερόλης που συσσωρεύονται και παραμένουν ανεκμετάλλευτες, προκάλεσαν οικονομική κρίση στους τομείς παραγωγής και εμπορίας της γλυκερόλης (McCoy, 2005, 2006). Επακόλουθο ήταν να μειωθεί η τιμή της σε σημείο να θεωρείται ένα απόβλητο με μηδενική ή και αρνητική ακόμα αξία (Adhikari *et al.* 2009). Ενδεικτικά το 2007, η ακάθαρτη γλυκερόλη κόστιζε 0\$/kg και χρησιμοποιούνταν μόνο για την παραγωγή βιοαερίου (Papanikolaou and Aggelis, 2009). Συνήθως η γλυκερόλη που παράγεται δεν είναι καθαρή αλλά περιέχει πλήθος προσμείξεων και υπολειμμάτων όπως αλκοόλες, βαρέα μέταλλα και ελεύθερα λιπαρά οξέα, άλατα και άλλες χημικές ουσίες που καθιστούν επιτακτικό τον καθαρισμό της προκειμένου η βιομηχανική γλυκερόλη να αποτελέσει πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω χημικών-βιοχημικών τεχνικών ή

βιοτεχνολογικών διεργασιών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δυνατότητα αξιοποίησης της ακάθαρτης γλυκερόλης μέσω μικροβιακών ζυμώνσεων για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως είναι το κιτρικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ, το προπιονικό οξύ, το μικροβιακό λίπος, οι πολυόλες, η αιθανόλη, η δι-υδροξυ-ακετόνη, τα πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκά οξέα και η 1,3-προπανοδιόλη (Papanikolaou and Aggelis, 2002; Lee et al., 2004; Ito et al., 2005; Koller et al., 2005; Yazdani and Gonzalez, 2007; Papanikolaou et al., 2008; Pyle et al., 2008; Amaral et al., 2009; da Silva et al., 2009; Andre et al., 2010; Fan et al., 2010; Chatzifragkou et al., 2011; Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012).

## **1.3 Ζύμες – Η ζύμη *Yarrowia lipolytica***

### **1.3.1 Ζύμες: Γενικά στοιχεία**

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων. Υπολογίζεται ότι μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωριστεί πάνω από 1500 είδη ζυμών που αποτελούν σχεδόν το 1% των μυκήτων. Η λέξη ζύμη έχει ινδο-ευρωπαϊκή προέλευση και σημαίνει «αφρός» ή «φούσκα». Πιθανολογείται ότι οι ζύμες είναι από τα πρώτα είδη μικροβίων που αποίκισαν τα οικοσυστήματα της γης. Από αρχαιολογικά ευρήματα διαπιστώνεται η χρήση τους από τον άνθρωπο σε πρωτόλεια προϊόντα ζύμωσης όπως ψωμί και μύρα από το 4000 π.Χ. Για πρώτη φορά παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο το 1680 από τον Antonie van Leeuwenhoek, έναν Ολλανδό επιστήμονα που θεωρείται εκ των πρώτων θεμελιωτών της Μικροβιολογίας ο οποίος δεν τις θεώρησε ζωντανούς μικροοργανισμούς αλλά κάποιο είδος σφαιρικών δομών. Το 1837 ο Theodor Schwann για πρώτη φορά αναγνώρισε τις ζύμες ως είδος μυκήτων δίνοντας τέλος στο ερώτημα αν πρόκειται για φύκη ή μύκητες. Σημαντική ήταν όμως η ανακάλυψη του Γάλλου Μικροβιολόγου Louis Pasteur, ο οποίος στο άρθρο του "Mémoire sur la fermentation alcoolique" απέδειξε ότι η αλκοολική ζύμωση τελείται από ζώντες ζυμομύκητες και όχι από χημικό καταλύτη. Παρατήρησε μάλιστα ότι με συνεχή διοχέτευση οξυγόνου στο περιβάλλον της ζύμης, η ζύμη αναπτύσσεται ενώ παρεμποδίζεται η ζύμωση, ένα φαινόμενο που αργότερα έμεινε γνωστό με το όνομα «φαινόμενο Pasteur» (Barnett, 2000).



Οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν τόσο στο χερσαίο όσο και στο υδάτινο και ατμοσφαιρικό περιβάλλον με το ιδανικό περιβάλλον αύξησης να αποτελούν υποστρώματα πλούσια σε σάκχαρα. Είναι χημειότροφοι μικροοργανισμοί και δεν χρειάζονται ηλιακή ενέργεια για να αναπτυχθούν. Μπορούν να καταναλώσουν πολλές πηγές άνθρακα (εξόζες: γλυκόζη, φρουκτόζη, δισακχαρίτες: σουκρόζη, μαλτόζη, πεντόζες: ριβόζη, ξυλόζη, αλκοόλες, οργανικά οξέα). Είναι είτε αερόβιοι είτε αναερόβιοι μικροοργανισμοί και αναπτύσσονται καλύτερα σε περιβάλλον με ουδέτερο ή ελαφρώς όξινο pH. Αναφορικά με την θερμοκρασία, αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από  $-2$  με  $20$  °C (*Leucosporidium frigidum*) έως και  $28$  με  $45$  °C (*Candida slooffi*). Το μέγεθος των ζυμών ποικίλλει από  $1-3$   $\mu\text{m}$  ενώ μπορούν να αυξηθούν έως και τα  $40$   $\mu\text{m}$  και αναπάργονται μέσω της διαδικασίας της μίτωσης.

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται παραδοσιακά σε πολλές διεργασίες της βιομηχανίας, όπως στην παραγωγή τροφίμων, αλκοολούχων ποτών, αρτοποιητικής βιομάζας, ζωοτροφών και μεταβολικών προϊόντων όπως ενζύμων, βιταμίνες, πολυσακχαρίτες, πολυόλες, λιπίδια, φωσφολιπίδια, κιτρικό οξύ, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα, και ενώσεις που συντίθενται με την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA σε ζυμομύκητες. Κάποια από αυτά τα προϊόντα παράγονται εμπορικά ενώ άλλα έχουν μεγάλη σημασία για τον τομέα της βιοτεχνολογίας. Στον πίνακα 1.4 που ακολουθεί παρατίθενται ορισμένες ζύμες και οι πιθανές χρήσεις τους στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και άλλων βιομηχανιών ζύμωσης (Demain, 1998).

**Πίνακας 1.4:** ζύμες και πιθανές χρήσεις τους στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και ζύμωσης

Εφαρμογή	Στέλεχος ζύμης
Ζύμωση μπύρας τύπου "ale"	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Διόγκωση ψωμιών και ζυμών (προζύμι)	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i> , " <i>Saccharomyces rosei</i> "
D-Αραβιτόλη (γλυκαντική ουσία)	<i>Candida diddensiae</i>
Γαλακτωματοποιητές	<i>Candida lipolytica</i>
Ζύμωση αιθανόλης	<i>S. cerevisiae</i>
Ιχθυοτροφές και πτηνοτροφές (ασταξανθίνη)	<i>Phaffia rhodozyma</i>
Ζωοτροφές και μονοκυτταρική πρωτεΐνη	<i>Candida utilis</i>
Ζύμωση λακτόζης και γάλακτος	<i>Candida pseudotropicalis</i> , " <i>Kluyveromyces fragilis</i> ", <i>Kluyveromyces lactis</i>
Ζύμωση μπύρας τύπου "lager"	" <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> " (= <i>S. pastorianus</i> )
Μαννιτόλη (ενυδατική ουσία)	" <i>Torulopsis mammitofaciens</i> "
Σάλτσα (Shoyu) και πάστα (Miso) σόγιας	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Ζύμωση κρασιού	<i>S. cerevisiae</i>
Ξυλιτόλη (γλυκαντική ουσία)	" <i>Torulopsis candida</i> "
Ζύμωση D-Ξυλόζης	<i>Candida shehatae</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> , <i>Pichia stipitis</i> , <i>Pichia segobiensis</i>

### 1.3.2 Η ζύμη *Yarrowia lipolytica*

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* ανήκει στο Φύλο Ascomycota, στην ομάδα Saccharomycetales και στην οικογένεια Dipodascaceae. Το Φύλο Ascomycota περιλαμβάνει 18.000 σαπροφυτικά και παρασιτικά είδη και έναν εξίσου μεγάλο αριθμό ειδών που δημιουργούν λειχήνες (περίπου 14.000). Στην τάξη Saccharomycetales περιλαμβάνονται οι ζύμες με μεγάλη σπουδαιότητα για την βασική βιολογική έρευνα, την βιομηχανία των τροφίμων και ποτών, την ιατρική και την βιοτεχνολογία. Τα στελέχη του γένους *Yarrowia*, όπως και όλες οι ζύμες πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλάστηση ή διχοτόμηση των κυττάρων. Εγγενώς πολλαπλασιάζονται με ασκοσπόρια σπόρια που παράγονται σε εξειδικευμένα κύτταρα, τους ασκούς. Ενώ αρχικά τα στελέχη του γένους *Yarrowia* είχαν τοποθετηθεί στο γένος *Candida*, το 1945 με το που ανακαλύφθηκε ο εγγενής τρόπος αναπαραγωγής τους από τον Wickerham, μετονομάστηκαν σε *Endomycopsis lipolytica* (Wickerham, 1953) ύστερα *Saccharomycopsis lipolytica* (Yarrow, 1972) και εν τέλει *Yarrowia lipolytica*. Δεν θεωρούνται παθογόνα τα στελέχη του γένους (Holzschu et al., 1979) και έχει ταξινομηθεί ως ασφαλές από την Αμερικανική Παραγωγή Τροφίμων Και Φαρμάκων (FDA) για την παραγωγή κιτρικού οξέος (Fickers et al., 2005). Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* μπορεί να αναπτυχθεί σε μεγάλο εύρος διαφορετικών συνθηκών, πάντα όμως κάτω από τους 32 °C και είναι αυστηρώς αερόβια ζύμη. Δεν είναι ιδιαίτερα πλούσια σε λίπος ζύμη, συνήθως γύρω στο 36%, με ειδικούς χειρισμούς όμως διάφορα φυσικά στελέχη δύνανται να παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες λίπους όταν αναπτύσσονται σε συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό και τρόπο καλλιέργειας (Paranikolaou and Aggelis, 2010; 2011a; 2011b). Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* απαντάται είτε με τη μορφή απλών κυττάρων, είτε ψευδομυκηλίου ή αληθινού μυκηλίου (Van der Walt, 1980), με την μορφολογία της να επηρεάζεται από το περιβάλλον αύξησης, το pH, την πηγή άνθρακα και αζώτου και τον αερισμό (Barnett et al., 1990; Bellou et al., 2014). Απαντάται στη φύση σε υποστρώματα πλούσια σε λίπη και πρωτεΐνες όπως γαλακτοκομικά προϊόντα, αλλαντικά, στο έδαφος, σε λύματα και έλαια μολυσμένα από πετρέλαιο. Λόγω της αερόβιας φύσης της, η *Yarrowia lipolytica* βοηθάει στον βιολογικό καθαρισμό των λυμάτων και ελαίων. Οι λιπάσες και τα πρωτεολυτικά ένζυμα που εκκρίνονται από την ζύμη εξωκυτταρικά προσδίδουν στην ζύμη την ικανότητα να αποικοδομεί πρωτεΐνες και λίπη (Roostita and Fleet, 1996). Η παραγωγή του ενζύμου της λιπάσης από την

*Yarrowia lipolytica* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για την βιοτεχνολογία, την βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και απορρυπαντικών (Coelho et al., 2010). Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* μπορεί να αφομοιώσει πολλές διαφορετικές πηγές άνθρακα όπως γλυκόζη, αλκοόλες, οξικό οξύ και υδρόφοβα υποστρώματα και παραπροϊόντα τους όπως η βιομηχανική γλυκερόλη, ενώ δεν μπορεί να καταναλώσει υποστρώματα με σακχαρόζη (Barnett et al., 1990; Arzumanov et al., 2000; Papanikolaou et al., 2008; Darvishi et al., 2009). Η ικανότητα της *Yarrowia lipolytica* να αφομοιώνει υποστρώματα πλούσια σε Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) έχει μελετηθεί επαρκώς και έχει αποδειχθεί η συμβολή της στην μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου όταν αναπτύσσεται σε τέτοιου είδους υποστρώματα (Lanciotti et al., 2004; Coelho et al., 2010; Sarris et al., 2011). Η καλλιέργεια της μάλιστα σε θρεπτικά μέσα πλούσια σε ΥΑΕ παρέχει την δυνατότητα παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως μεγάλων ποσοστών κιτρικού οξέος όταν η αύξηση πραγματοποιείται σε μέσα με περιοριστικό παράγοντα το άζωτο. Αξιόλογη κρίνεται επίσης η ιδιομορφία των διαφόρων στελεχών της *Yarrowia lipolytica* που την καθιστούν από πολλούς ερευνητές ένα μοντέλο μικροοργανισμού για την μελέτη του φαινομένου του διμορφισμού στις ζύμες (Szabo R., 1999).

### **1.3.3 Βιοτεχνολογικές χρήσεις της ζύμης *Yarrowia lipolytica***

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* είναι μία από τις πιο μελετημένες μη-συμβατικές ζύμες με πλήθος ερευνών και άρθρων να επικεντρώνονται σε αυτήν. Υπάρχει τεράστιο ενδιαφέρον από το σύνολο της βιοτεχνολογικής κοινότητας, για τον λόγο ότι η ζύμη αυτή έχει τεράστια βιοχημική δυνατότητα να παράγει διάφορα μεταβολικά προϊόντα προστιθέμενης αξίας σε μεγάλες ποσότητες, αξιοποιώντας βιομηχανικά υποπροϊόντα-απόβλητα. Η πρωτοτυπία αυτή έναντι άλλων μικροοργανισμών καθιστά την ζύμη εξαιρετικά χρήσιμη για την παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων όπως κιτρικού και άλλων οργανικών οξέων, λιπαρών υλών σπάνιας σύστασης, μικροβιακών πρωτεϊνών και βιομάζας, λακτονών και διαφόρων ενζύμων. Αξίζει να αναφερθεί ότι είναι ο μοναδικός ελαιογόνος μικροοργανισμός του οποίου το γονιδίωμα έχει ταυτοποιηθεί και χρησιμοποιείται ως πρότυπο για την έρευνα των διεργασιών συσσώρευσης και αποδόμησης λιπιδίων (Papanikolaou and Aggelis, 2003; Beopoulos et al., 2008).

Η δυνατότητα της ζύμης *Yarrowia lipolytica* να υδρολύει υποστρώματα λιπαρών υλών και να χρησιμοποιεί τα προϊόντα της υδρόλυσης σαν πηγή άνθρακα και ενέργειας, προσδίδει ένα τεράστιο πλεονέκτημα έναντι άλλων μικροοργανισμών. Μπορεί να αναπτύσσεται σε υδρόφιλα ενδοναίτηματα, όπως για παράδειγμα σε περιβάλλοντα που υπάρχει ρύπανση από πετρέλαιο και να υδρολύει αλκάνια, λιπαρά οξέα και έλαια σε αυτά επιτελώντας ουσιαστικά βιο-εξυγίανση και απορρύπανση (Fickers et al., 2005; Bankar et al., 2009). Σημαντική είναι επίσης για την βιομηχανία, η χρήση στελεχών της ζύμης αυτής για την παραγωγή βιομάζας με την μορφή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP) και ενδοκυτταρικού λίπους (SCO) (Papanikolaou and Aggelis, 2010; Nicaud, 2012).

## **1.4 Παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα από την ζύμη *Yarrowia lipolytica***

### **1.4.1 Πολυόλες**

Πρόκειται για αλκοόλες με πολλές ομάδες υδροξυλίου στο μόριό τους που έχουν μεγάλη σημασία τόσο για την επιστήμη των τροφίμων όσο και για την χημεία των πολυμερών. Είναι αλδόζες η κετόζες οι οποίες με αναγωγικά μέσα, ανάγονται στο σημείο της καρβονυλικής ομάδας σε πολυσθενείς αλκοόλες, τις αλδιτόλες. Από την *Yarrowia lipolytica* παράγονται η μαννιτόλη, η ερυθριτόλη, και η αραβιτόλη (Belitz et al., 2009).

#### **1.4.1.1 Μαννιτόλη**

Η μαννιτόλη είναι μία πολυσθενής αλκοόλη ( $C_6H_{14}O_6$ ) με έξι άτομα άνθρακα. Βρίσκει πολλές εφαρμογές στην ιατρική, στην βιομηχανία των τροφίμων, των φαρμάκων και στην αναλυτική χημεία. Φυσικά βρίσκεται σε διάφορα φυτά όπως κωνοφόρα δέντρα, φύκη και μανιτάρια. Η παραγωγή της σε βιομηχανικό επίπεδο γίνεται κατά κύριο λόγο με χημική σύνθεση μέσω της υδρογόνωσης της φρουκτόζης σε σύνθηκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης. Η διαδικασία αυτή δεν είναι αποτελεσματική καθώς απαιτεί υψηλή καθαρότητα των υποστρωμάτων. Για τον λόγο αυτό εμφανίζει μεγάλες προοπτικές η βιοτεχνολογική παραγωγή της.

### 1.4.1.2 Ερυθριτόλη

Η ερυθριτόλη είναι μία αλκοόλη αποτελούμενη από τέσσερα άτομα άνθρακα ( $C_4H_{10}O_4$ ) ενώ παράγεται κυρίως μικροβιολογικά. Βρίσκεται φυσικά σε μικρές ποσότητες σε φρούτα και ζυμούμενα προϊόντα τροφίμων. Χρησιμοποιείται από την βιομηχανία τροφίμων ως γλυκαντική ύλη αφού είναι περίπου όσο γλυκιά είναι και η σουκρόζη (70–80 %) χωρίς να έχει θερμιδικό φορτίο και να επηρεάζει το σάκχαρο του αίματος. Παράγεται βιομηχανικά μόνο μέσω ζύμωσης της γλυκόζης με κάποιο στέλεχος ζύμης. Ως πρόσθετο τροφίμων η χρήση της έχει εγκριθεί ως ασφαλής σε ολόκληρο τον κόσμο (Tomaszewska et al., 2012).

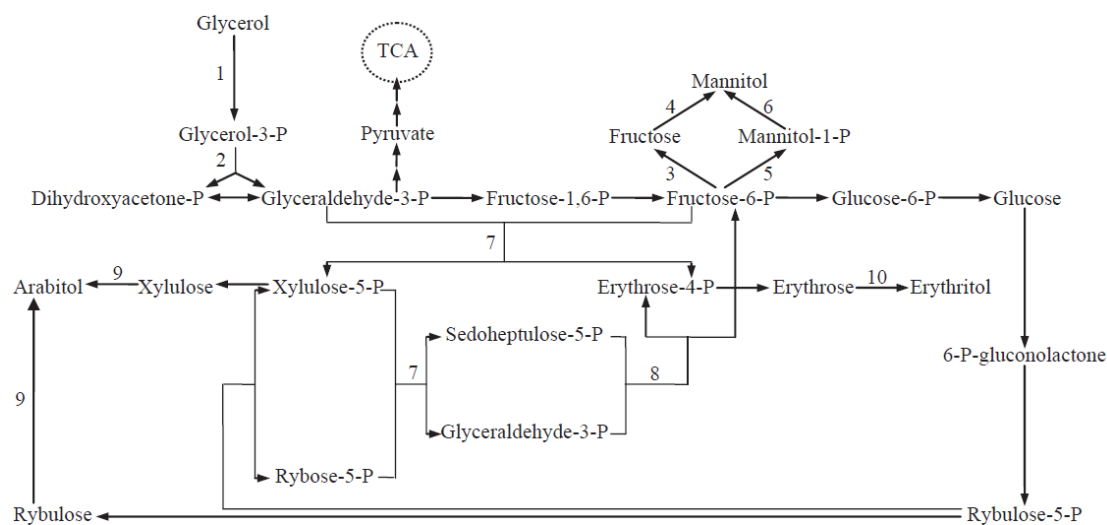
### 1.4.1.3 Αραβιτόλη

Η αραβιτόλη είναι μία αλκοόλη αποτελούμενη από πέντε άτομα άνθρακα ( $C_5H_{12}O_5$ ). Είναι διαλυτή στο νερό, έχει κρυσταλλική μορφή, άοσμη και με γλυκαντική ισχύ. Χρησιμοποιείται τόσο στην βιομηχανία τροφίμων ως γλυκαντικό τροφίμων, όσο και στην παραγωγή θεραπευτικών ουσιών. Έχει παραπλήσια γλυκαντική ισχύ σαν την σουκρόζη με πολύ χαμηλό θερμιδικό φορτίο ( $0.2 \text{ kcal g}^{-1}$ ). Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για χημικά προϊόντα όπως προπυλένιο, ξυλιτόλη, αραβινικά και ξυλονικά οξέα (Koganti et al., 2011). Σήμερα η αραβιτόλη παράγεται σε βιομηχανικό επίπεδο, με χημική αναγωγή των λακτονών του αραβινονικού και λυξονικού οξέος, αντίδραση που προϋποθέτει παρουσία ισχυρού καταλύτη και θερμοκρασίες άνω των  $100^\circ\text{C}$  (Kumdam et al. 2013). Λόγω του μεγάλου κόστους της συγκεκριμένης χημικής διεργασίας, μεγάλο μέρος της ερευνητικής δραστηριότητας επικεντρώνεται πλέον στην παραγωγή αραβιτόλης με μικροβιακή ζύμωση με στελέχη της ζύμης *Y. Lipolytica* καθιστώντας την όλη διεργασία πιο οικονομική και τελικό προϊόν με λιγότερες προσμείξεις (Zhang et al. 2014).

### 1.4.1.4 Βιοσύνθεση πολυολών

Η παραγωγή πολυολών με στελέχη της *Y. Lipolytica* είναι ένα φαινόμενο που έχει μελετηθεί επαρκώς ειδικά σε υπόστρωμα καθαρής και ακάθαρτης γλυκερόλης. Παρατηρείται μεγαλύτερη παραγωγή πολυολών από στελέχη που εμφανίζουν μεγαλύτερη ανοχή για υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και αλάτων (Tomaszewska et

al., 2014). Ακολουθεί η εικόνα 1.12 στην οποία παρουσιάζεται ο τρόπος βιοσύνθεσης των πολυολών.



**Εικόνα 1.12:** Βιοσύνθεση πολυολών (Park et al., 2005).

## 1.4.2 Ενδοπολυσακχαρίτες

Οι ενδοπολυσακχαρίτες είναι πολυμερή αποτελούμενα από μονοσακχαρίτες. Οι γλυκάνες, όπως αποκαλούνται επιστημονικά οι ενδοπολυσακχαρίτες (BeMiller, 1996; Belitz et al., 2009), έχουν χημικό τύπο  $(C_6H_{10}O_5)_n$  με  $n > 100$ . Ανάλογα με την μορφή του μονοσακχαρίτη που συνδέεται στο μόριο, οι ενδοπολυσακχαρίτες μπορεί να έχουν είτε γραμμική είτε διακλαδισμένη διάταξη ενώ ο βαθμός πολυμερισμού, δηλαδή ο αριθμός των μονοσακχαριτών στον πολυσακχαρίτη συνήθως είναι 200-300.

Στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς χρησιμεύουν ως αποταμιευτικές και δομικές ύλες ενώ περίπου το 90% της μάζας υδατάνθρακα στη φύση είναι με τη μορφή πολυσακχαριτών. Πολυσακχαρίτες με δύο ως εννέα μονοσακχαρίτες στο μόριο τους ονομάζονται ολιγοσακχαρίτες, ενώ ανάλογα με το είδος των σακχάρων από τους οποίους αποτελούνται διακρίνονται σε ομοπολυσακχαρίτες ή ετεροπολυσακχαρίτες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν το άμυλο ή η κυτταρίνη, ενώ στη δεύτερη ανήκουν οι πηκτίνες.

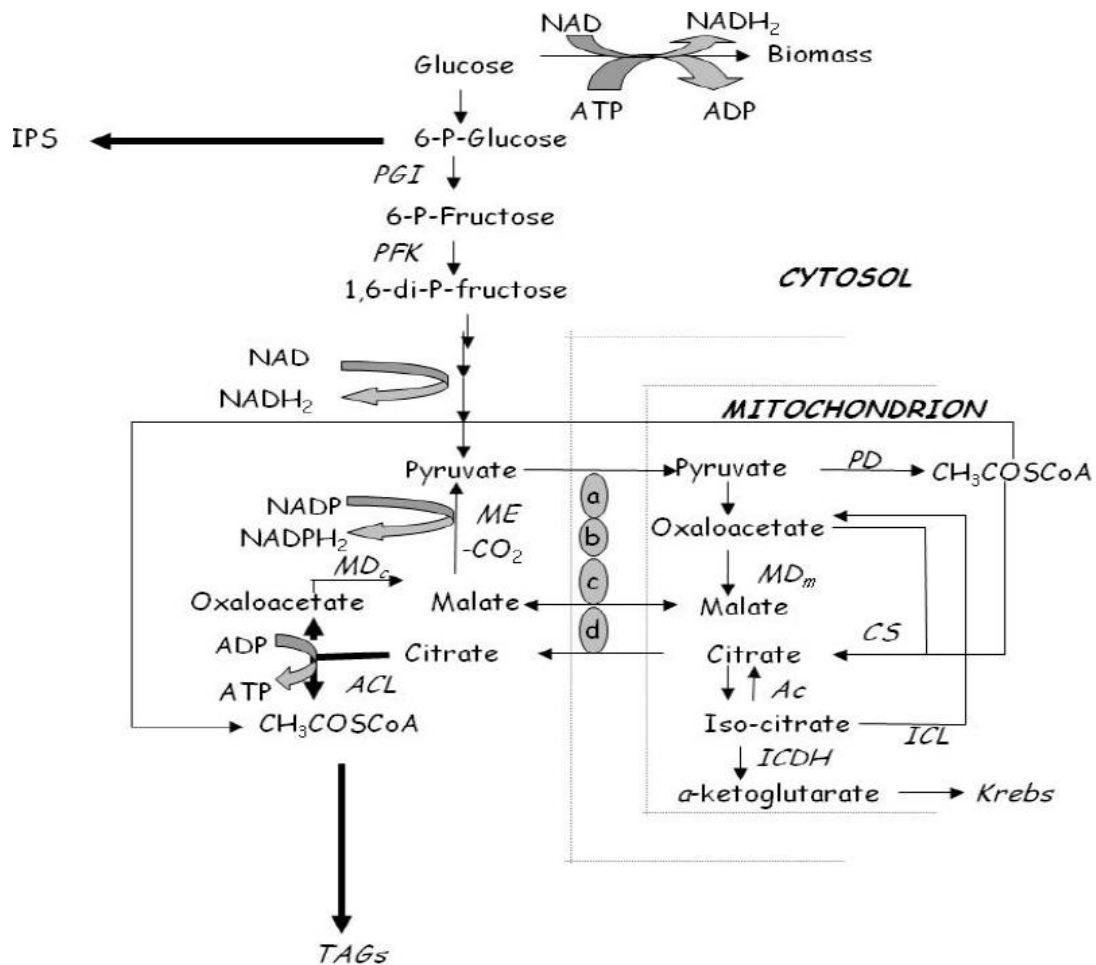
Οι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική (Stacey, 1967) και στην βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Η χρήση μυκήτων για την παραγωγή έξω και ένδο πολυσακχαριτών έχει ερευνηθεί επαρκώς με τους παραγόμενους ενδοπολυσακχαρίτες να παρουσιάζουν φαρμακευτικές και θεραπευτικές δράσεις με

αντικαρκινικές και ανοσολογικές ιδιότητες σε διάφορες περιπτώσεις. Οι πολυσακχαρίτες που εμφανίζουν τέτοιες ιδιότητες ανήκουν στις ετερο-β-γλυκάνες (Tang and Zhong, 2002), οι οποίες συνήθως αποτελούνται από μόρια γλυκόζης ενωμένα με β-(1,3)-γλυκοσιδικούς δεσμούς στα οποία συνδέονται με διακλαδώσεις μόρια γλυκόζης με γλυκοσιδικό δεσμό β-(1,6) (Seviour et al, 1992; Fazenda et al.,2008)

Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες από τους μύκητες προέρχονται από ζυμώσεις υγρής καλλιέργειας βυθού ή από ζυμώσεις στερεής κατάστασης. Έχει αποδειχθεί ότι οι συνθήκες υπό τις οποίες τελείται η ζύμωση καθώς και η σύσταση του μέσου καλλιέργειας, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την σύσταση των παραγόμενων πολυσακχαριτών (Wu et al.,2006). Μάλιστα η παραγωγή των πολυσακχαριτών ευνοείται σημαντικά όταν σαν πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται γλυκόζη και σαν πηγή αζώτου διάφορες οργανικές μορφές του όπως εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη, corn steep liquor (Tang and Zhong, 2002; Gern et al., 2008). Η μεγάλη παραγωγή βιομάζας ανταγωνίζεται και δεν επιτρέπει την μεγάλη συσσώρευση πολυσακχαριτών ενώ παρατηρείται και το αντίθετο (Diamantopoulou et al., 2012a; 2012b; 2014, Tang and Zhong, 2002). Οι πολυσακχαρίτες που παράγονται από μύκητες μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες (φρουκτόζη), δισακχαρίτες (τρεχαλόζη), πολυόλες (μανιτόλη) και κατά κύριο λόγο πολυσακχαρίτες όπως γλυκογόνο, πουλλουλάνες, β-γλυκάνες κ.α (Seviour et al., 1992; Galiotou-Panayiotou et al., 1998; Tang and Zhong, 2002; Fazenda et al., 2008; Tang et al., 2008; 2011; Diamantopoulou et al., 2014).

#### **1.4.2.1 Βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών**

Σε πολλές έρευνες παρατηρείται σε βιοχημικό επίπεδο, ότι η μικροβιακή παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών ευνοείται όταν στο μέσο καλλιέργειας εξαντλείται η πηγή αζώτου (μηχανισμός που μοιάζει αρκετά με αυτόν της βιοσύνθεσης και συσσώρευσης λιπιδίων). Για να εξασφαλιστούν οι απαιτήσεις του κυττάρου σε άζωτο το AMP διασπάται και προκαλεί αναστολή του ενζύμου της 6-φωσφορο φρουκτοκινάσης (6 PFK). Η αλλοστερική ενεργοποίηση του ενζύμου αυτού από το AMP μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική συσσώρευση των πολυσακχαριτών (Galiotou-Panayotou et al., 1998; Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2011a). Στην εικόνα 1.13 που ακολουθεί απεικονίζεται το υποθετικό σενάριο της βιοσύνθεσης των πολυσακχαριτών.



**Εικόνα 1.13:** Συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων από μικροοργανισμούς (Papanikolaou and Aggelis, 2009).

### 1.4.3 Κιτρικό οξύ

Το κιτρικό οξύ ( $C_6H_8O_7$ ) είναι ένα οργανικό οξύ του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA). Είναι ενδιάμεσο του κύκλου μεταβολισμού των σακχάρων στους ζωντανούς οργανισμούς, μεγάλης βιολογικής σημασίας, αφού αποτελεί μέρος της διαδικασίας κατά την οποία οι ζωντανοί οργανισμοί μετατρέπουν την τροφή σε ενέργεια. Βρίσκεται φυσικά σε πολλά εσπεριδοειδή φρούτα (π.χ λεμόνια, πορτοκάλια), σε ανανάδες, στα αχλάδια, στα δαμάσκηνα, και σε ζωϊκούς μύς και οστά (Najafrou, 2006; Roukas, 2000). Η ονομασία του προέρχεται από τη λατινική λέξη “citrus” , το δέντρο κίτρο. Για πρώτη φορά απομονώθηκε από τον χυμό λεμονιού το 1784 από τον Carl Steele, έναν Σουηδό χημικό. Χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων, αρωμάτων και χημικών υλών ως ρυθμιστής οξύτητας, αρωματικό



συστατικό και για την δημιουργία αλάτων. Στον πίνακα 1.5 που ακολουθεί διακρίνονται οι εφαρμογές του κιτρικού οξέος.

**Πίνακας 1.5:** Εφαρμογές του κιτρικού οξέος στην βιομηχανία

Βιομηχανικός τομέας	Ιδιότητα	Χρήση	Μερίδιο αγοράς
<i>Τρόφιμα</i>			Περίπου 75%
Ποτά	Οξίνιση	Αρτυματική	
Ζελέ, μαρμελάδες κ.α.	Αρτυματική	Οξίνιση	
Λίπη και έλαια	Αντιοξειδωτική	Συμπλοκοποίηση μετάλλων	
Κατεψυγμένα τρόφιμα	Αντιοξειδωτική		
<i>Φαρμακευτικά είδη</i>			Περίπου 10%
Αναβράζοντα	Οξύς	Γεύση	
Βιταμίνες	Αντιοξειδωτική		
Αντιπηκτικά	Διαχωριστική	Ρυθμιστική	
Σκευάσματα σιδήρου	Σχηματισμός αλάτων		
Καλλυντικά	Ρυθμιστική	Αντιοξειδωτική	
<i>Χημική βιομηχανία</i>			Περίπου 15%
Καθαριστικά μετάλλων	Διαχωριστική		
Απορρυπαντικά	Ρυθμιστική	Διαχωριστική	
Φωτογραφικά	Ρυθμιστική		
Πολυμερισμός	Διαχωριστική		

(Mattey *et al.*, 1999)

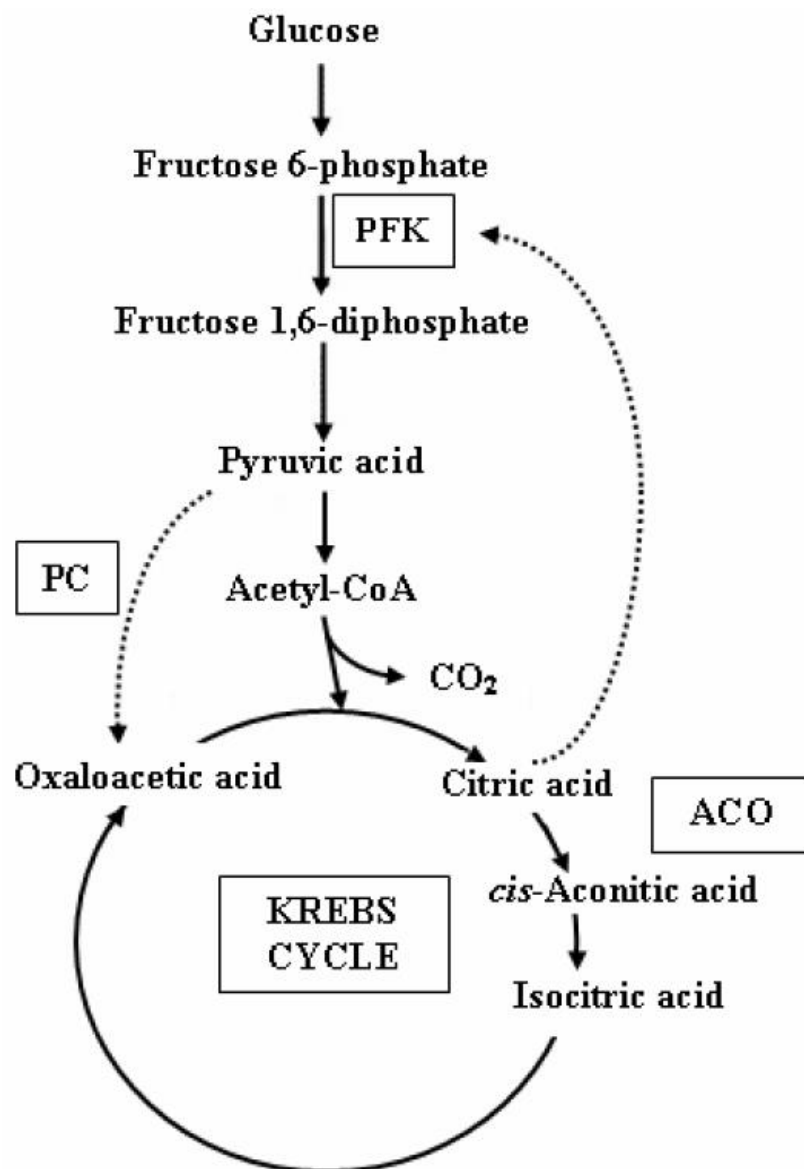
Το κιτρικό οξύ είναι μία χημική ένωση με μεγάλη πρακτική σημασία για την βιομηχανία και παράγεται σε τεράστιες ποσότητες σε παγκόσμιο επίπεδο. Μόνο το 2007 παράχθηκαν πάνω από 1,6 εκατομμύρια τόνοι κιτρικού οξέος (Berovic and Legisa, 2007) με ένα μεγάλο ποσοστό αυτού (35-40%) να παράγεται στην Κίνα. Για την παραγωγή του δεν χρησιμοποιούνται πλέον χημικές μέθοδοι, αφού κρίνονται μη οικονομικές και λιγότερο αποτελεσματικές έναντι της βιοτεχνολογικής παραγωγής του οξέος. Οι κακές αποδοσεις τελικού προϊόντος, η υψηλή αξία του αρχικού υλικού εκκίνησης, τα πολλά ενδιάμεσα στάδια και οι επικίνδυνες χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην διεργασία οδήγησαν την επιστημονική κοινότητα να αναζητήσει εναλλακτικούς τρόπους παραγωγής του κιτρικού οξέος, μέσω μικροβιακής ζύμωσης με χρήση στελεχών ανωτέρων μυκήτων. Σε βιομηχανικό επίπεδο, η παραγωγή του κιτρικού οξέος είναι το κύριο βιοτεχνολογικό προϊόν που παράγεται με μικροβιακή ζύμωση (Soccol *et al.*, 2006; Berovic and Legisa, 2007). Σε συνθήκες υγρής καλλιέργειας βυθού έχουν χρησιμοποιηθεί στελέχη *Aspergillus niger* (Soccol *et al.*, 2006; Papanikolaou and Aggelis, 2009) και διάφορα στελέχη του γένους *Yarrowia* σε διαφορετικά υποστρώματα. Η χρήση της ζύμης *Yarrowia lipolytica* έναντι του

*Aspergillus niger*, σε διάφορες έρευνες εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα ζύμωσης όπως:

- Γρηγορότερη ανάπτυξη
- Μικρότερος χρόνος ζύμωσης και μεγαλύτερη παραγωγικότητα
- Μικρότερος κίνδυνος επιμόλυνσης της καλλιέργειας
- Μεγαλύτερη αντοχή σε αρχικές υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων
- Δυνατότητα χρήσης πολλών περισσότερων διαφορετικών υποστρωμάτων
- Δυνατότητα χρήσης μη επεξεργασμένων υποστρωμάτων που περιέχουν συγκεντρώσεις μεταλλικών ιόντων, π.χ αποβλήτων (Roukas, 2006; Socol et al., 2006; Max et al., 2010).

#### **1.4.3.1 Βιοσύνθεση κιτρικού οξέος**

Σε βιοχημικό επίπεδο, η βιοσύνθεση και παραγωγή του κιτρικού οξέος από μικροοργανισμούς ευνοείται, όταν η πηγή αζώτου εξαντληθεί εξω- και ενδο-κυτταρικά (Ratledge, 1994; Morgunov et al., 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2011a). Η διεργασία παραγωγής και έκκρισης του κιτρικού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας είναι ίδια με αυτήν της βιοσύνθεσης και συσσώρευσης των λιπιδίων από ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Καθοριστικός παράγοντας για την παραγωγή και των δύο είναι η εξάντληση των πηγών αζώτου του κυττάρου στο μέσο της καλλιέργειας. Η μείωση του ενδοκυτταρικού AMP προκαλεί την παρεμπόδιση των ενζύμων NAD<sup>+</sup> και NADP<sup>+</sup> ισο-κιτρικής αφυδρογονάσης που είναι υπεύθυνα για την μετατροπή του ισο-κιτρικού οξέος σε α-κετογλουταρικό οξύ. Η παρεμπόδιση της δράσης αυτών των ενζύμων έχει σαν συνέπεια την συσσώρευση του κιτρικού οξέος στο μιτοχόνδριο του κυττάρου (Ratledge, 1994; Ratledge and Wynn, 2002). Όταν η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος στο μιτοχόνδριο ξεπεράσει μία κρίσιμη τιμή, εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Στην εικόνα 1.14 που ακολουθεί απεικονίζεται αναλυτικά ο τρόπος που βιοσυντίθεται το κιτρικό οξύ.

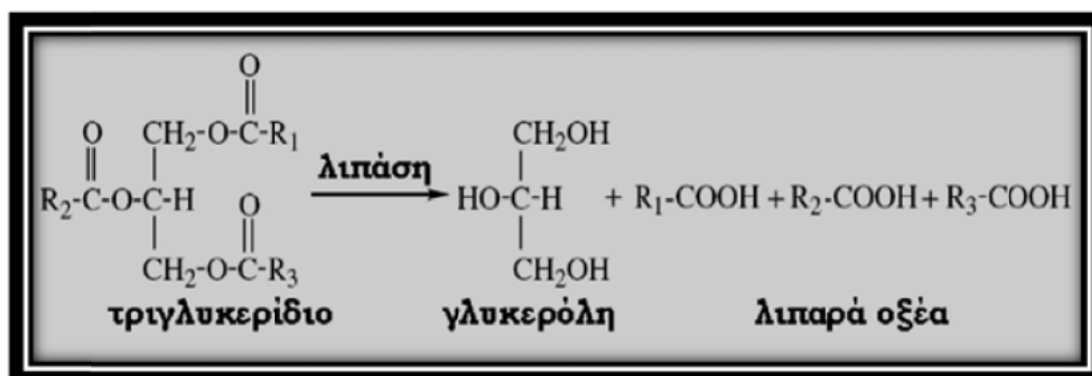


**Εικόνα 1.14:** Βιοχημικό μονοπάτι βιοσύνθεσης κυτρικού οξέος (Max et al., 2010).

#### 1.4.4 Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι βιομόρια που δεν διαλύονται στο νερό αλλά μόνο σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες. Από χημική άποψη μπορούν να ανήκουν σε αυτά πολλές κατηγορίες οργανικών ενώσεων όπως λίπη, κηροί, στερόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες, μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια και άλλα. Οι κύριες βιολογικές λειτουργίες των λιπιδίων σχετίζονται με την αποθήκευση ενέργειας, ενώ αποτελούν το κύριο δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ουσίες αυτές είναι πολύ διαδεδομένες στη φύση και αποτελούν μία από τις κύριες θρεπτικές ύλες της διατροφής του ανθρώπου μαζί με τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες. Έχουν

εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών, καυσίμων και στη νανοτεχνολογία ( Maitland et al., 1998).



**Εικόνα 1.15:** Αποικοδόμηση των λιπιδίων (Papanikolaou and Aggelis, 2011).

#### 1.4.4.1 Βιοσύνθεση κυτταρικών λιπιδίων

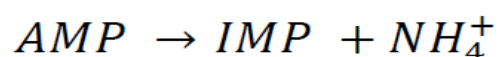
Όλοι οι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να συνθέσουν λιπίδια για να εφοδιάσουν τις δομές τους (π.χ μεμβράνες) καθώς και για διάφορους άλλους λειτουργικούς σκοπούς. Όμως μόνο οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να συσσωρεύουν λιπίδια στο εσωτερικό των κυττάρων τους σε σημαντικές ποσότητες λιπιδίων. Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί σε αντίθεση με τους υπόλοιπους, δεν διαθέτουν ένα υπερδραστήριο σύστημα βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, αλλά μπορούν να παράγουν σημαντικές ποσότητες ακέτυλο-συνενζύμου A (acetyl-CoA), το οποίο είναι η βασική μονάδα βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων.

Η συσσώρευση λιπιδίων σε έναν μικροοργανισμό επιτυγχάνεται όταν χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα γλυκόζη, ή κάποιο άλλο παρόμοια μεταβολιζόμενο συστατικό, ενώ παράλληλα επικρατούν συνθήκες περιοριστικές σε άζωτο. Αφού εξαντήθει το άζωτο, περιορίζεται η αύξηση του μικροοργανισμού. Αυτό συμβαίνει διότι το άζωτο αποτελεί δομικό συστατικό των πρωτεϊνών και των νουκλεοτιδίων, ενώ η περίσσεια της πηγής άνθρακα (γλυκόζη ή άλλος υδατάνθρακας) που συνεχίζει να αφομοιώνεται από τα κύτταρα του μικροοργανισμού μετατρέπεται σε τριγλυκερίδια μέσα στην κυτταρική του μάζα (*de novo* συσσώρευση λιπιδίων). Στην περίπτωση που σαν πηγή άνθρακα χρησιμοποιούνται υδροφοβικά υποστρώματα (*ex novo* συσσώρευση λιπιδίων) όπως για παράδειγμα τα βιομηχανικά λίπη, τα φυτικά έλαια, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, εστέρες των λιπαρών οξέων κ.α τότε η συσσώρευση λιπιδίων είναι ανεξάρτητη από την

εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Τότε η συσσώρευση των λιπιδίων πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την σύνθεση της βιομάζας ελεύθερης ελαίου του μικροοργανισμού (Ratledge, 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2011a). Στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς που καλλιεργούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιορισμένη πηγή αζώτου, περιορίζεται ο περαιτέρω κυτταρικός πολλαπλασιασμός τους ή όταν αφομοιώνεται η περίσσεια του άνθρακα, μετατρέπεται μέσα στην κυτταρική τους μάζα σε ενδοπολυσακχαρίτες (Philippoussis and Diamantopoulou, 2011). Για αυτούς τους μικροοργανισμούς δεν ισχύει δηλαδή ο μηχανισμός της *de novo* συσσώρευσης λιπιδίων και σπανίως η περιεκτικότητα της βιομάζας αυτών σε έλαιο ξεπερνάει το 10%.

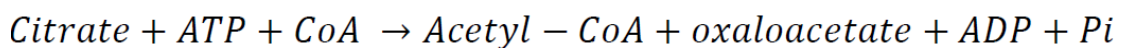
Απο διάφορες έρευνες, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες λιπιδίων στην κυτταρική του μάζα εξαρτάται από δύο παράγοντες: α) από την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει συνεχώς ακέτυλο-συνένζυμο A (acetyl-CoA) στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, το οποίο αποτελεί πρόδρομο μόριο για την σύνθεση των λιπαρών οξέων και β) την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει επαρκή ποσότητα NADPH, το οποίο αποτελεί αναγωγικό μέσο για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (Beoroulos et al., 2009; Papanikolaou and Aggelis, 2009; Fakas, 2017).

Μετά την εξάντληση του αζώτου από το μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού ακολουθούν μία σειρά από αντιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία ακέτυλο-συνένζυμο A. Έπειτα από την εξάντληση του αζώτου, προκαλείται μία ταχεία μείωση της AMP (ενδοκυτταρικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης) καθώς ο μικροοργανισμός διασπά την AMP σε μονοφωσφορική αδενοσίνη (IMP) με την βοήθεια του ενζύμου της AMP-απαμινάσης σύμφωνα με την παρακάτω βιοχημική αντίδραση:

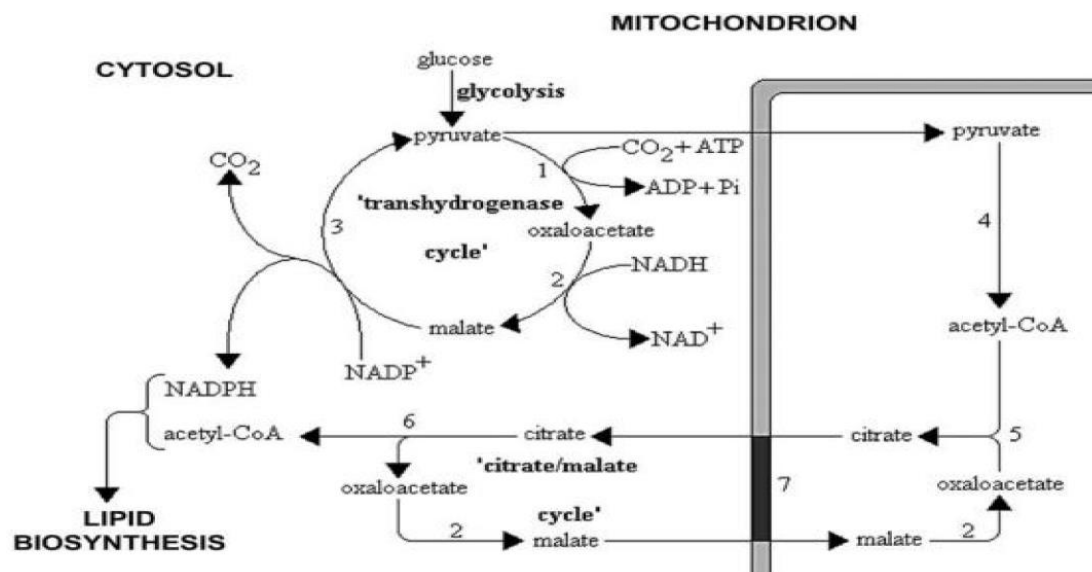


Η βιοχημική αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εξασφάλιση ιόντων  $NH_4^+$ , τα οποία αποτελούν συμπληρωματική πηγή αζώτου και βοηθούν στην βιοσύνθεση των κυττάρων ύστερα από τον περιορισμό του εξωκυτταρικού αζώτου. Η μείωση της ενδοκυτταρικής AMP αναστέλλει την δράση του ενζύμου της ισο-κιτρικής

αφυδρογονάσης (ICDH) με συνέπεια το κιτρικό οξύ να μην μεταβολίζεται και να συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο. Στην συνέχεια το κιτρικό οξύ εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται από την ATP-κιτρική λυάση (δεν απαντάται στους μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς) σε ακέτυλο-συνένζυμο Α και οξαλοξικό οξύ σύμφωνα με την αντίδραση:



Όπου ADP είναι η διφωσφορική αδενοσίνη και Pi είναι το ορθοφωσφορικό ανιόν. Μέσω της ανεστραμμένης β-οξειδωσης, το ακετυλο-CoA θα δημιουργήσει τα ενδοκυτταρικά λιπαρά οξέα (Papanikolaou and Aggelis, 2011; Ratledge 2004). Στην εικόνα 1.16 που ακολουθεί φαίνεται ο κύκλος του μηλικού-κιτρικού (citrate/malate cycle) και ο κύκλος του Krebs (transhydrogenase cycle) μέχρι την παραγωγή του ακετυλο-CoA και του NADPH για την ελαιογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς.



**Εικόνα 1.16:** ο κύκλος του μηλικού-κιτρικού (citrate/malate cycle) και ο κύκλος του Krebs (transhydrogenase cycle) μέχρι την παραγωγή του ακέτυλο-CoA και του NADPH για την ελαιογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1. Αποκαρβοξυλάση του πυρουβικού οξέος, 2. Αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. Μηλικό ένζυμο, 4. Αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. Κιτρική συνθάση, 6. ATP κιτρική λυάση, 7. Ένζυμο μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος (Ratledge, 2004).

Όπως αναφέρθηκε και πιο πριν, η παρουσία του NADPH κρίνεται απαραίτητη για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Τα συνένζυμα αυτά παρέχονται από τον κύκλο του μηλικού οξέος. Τα λιπαρά οξέα που δημιουργούνται ενδοκυτταρικά, εστεροποιούνται

στο μόριο της γλυκερόλης για να σχηματίσουν τριγλυκερίδια (TAGs) τα οποία μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου διακινούνται για να σχηματίσουν λιποσωμάτια (Ratledge, 2004). Σε αντίθεση με τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς κάποιες ζύμες παρότι είναι ελαιογόνες, στην ισόρροπη φάση της αύξησης παράγουν και μεγάλες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών η συσσώρευση των οποίων είναι ανταγωνιστική προς την παραγωγή λιπιδίων (Athenaki et al.,2018).

## 1.5 Σκοπός της μελέτης

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) είναι τα κύρια υποπροϊόντα της επεξεργασίας του ελαιοκάρπου για την παραλαβή του ελαιολάδου. Η εναπόθεση των αποβλήτων αυτών, χωρίς μάλιστα να έχει προηγηθεί κατεργασία, είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται συχνά και αποτελεί μεγάλο παράγοντα μόλυνσης για τις ελαιοκομικές περιοχές και μεγάλο πρόβλημα για την βιομηχανία. Πολλές μελέτες στρέφουν την προσοχή τους στην χρήση υποστρωμάτων με βάση τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου για διάφορες μικροβιακές ζυμώσεις. Η χρήση και προσθήκη των ΥΑΕ στο μέσο καλλιέργειας διαφόρων μικροοργανισμών, αποτελεί μία ελπιδοφόρο μέθοδο βιοτεχνολογικής επεξεργασίας και απορρύπανσης των απόνευρων αυτών με ταυτόχρονη παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί ραγδαία αύξηση στην παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως του βιοντήζελ. Παραπροϊόν της παραγωγής βιοντήζελ, είναι η ακάθαρτη γλυκερόλη με εμπορική αξία αρκετά χαμηλή (ή και μηδενική) η οποία παράγεται σε τεράστιες ποσότητες σε παγκόσμιο επίπεδο. Αποτελεί ένα υποσχόμενο υλικό εκκίνησης για παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η ικανότητα της ζύμης *Yarrowia lipolytica* να αναπτύσσεται σε υποστρώματα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη εμπλουτισμένη με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών. Η μοναδικότητα της μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι για πρώτη φορά μελετάται η ικανότητα της *Yarrowia lipolytica* να αναπτύσσεται σε συνδυασμό ΥΑΕ-γλυκερόλης για την παραγωγή βιομάζας, μεταβολικών προϊόντων (πολυολών και κιτρικού οξέος) και δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακό λίπος και ενδοπολυσακχαρίτες). Στην συγκεκριμένη μελέτη τα ΥΑΕ χρησιμοποιούνται με τέτοιο τρόπο ώστε, όντας υγρό ζύμωσης και υπόστρωμα, να δύνανται να υποκαταστήσουν τουλάχιστον εν μέρει, το νερό ζύμωσης που θα χρησιμοποιείται στην βιοδιεργασία. Επίσης σκοπός της μελέτης είναι να εξεταστεί η δυνατότητα αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού των στελεχών της *Y. Lipolytica* στο υγρό της καλλιέργειας με προσθήκη ΥΑΕ. Οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν σε υπόστρωμα ΥΑΕ με διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών και σταθερές συνθήκες ανάδευσης και



θερμοκρασίας. Η γλυκερόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαχωρισμένη και καθαρότητας 88.5% κατά βάρος.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 Χαρακτηριστικά στοιχεία και προδιαγραφές ΥΑΕ- γλυκερόλης

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) που χρησιμοποιήθηκαν, παραλήφθηκαν από τριφασικό ελαιοτριβείο από την περιοχή των Χανίων στην Κρήτη και κατευθείαν ψύχθηκαν σε θερμοκρασία  $T = -20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  προκειμένου να διατηρήσουν τα χαρακτηριστικά τους. Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα αποψύχθηκαν και έγινε η απομάκρυνση των στερεών και των υπολειμμάτων με φυγοκέντριση (9000 rpm, 15 min,  $T = 21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  – Hettich Universal 320R). Η συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις στα ΥΑΕ εκφρασμένες σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ήταν  $\sim 3,5 \text{ g/L}$ , και η συγκέντρωση των σακχάρων (γλυκόζης, φρουκτόζης) σε αυτά ήταν αμελητέα. Η συγκέντρωση ελαιολάδου στον κασίγαρο ήταν επίσης αμελητέα ( $\sim 0,2 \text{ g/L}$  όπως βρέθηκε με τριπλή εκχύλιση με εξάνιο). Το pH του κασίγαρου ήταν 5,5 ύστερα από μέτρηση, ενώ σε αυτόν υπήρχαν πολύ μικρές ποσότητες οργανικών οξέων κυρίως οξικό και γλυκονικό με συγκεντρώσεις  $0,4 \pm 0,1 \text{ g/L}$  και  $2,0 \pm 0,5 \text{ g/L}$  αντίστοιχα.

Η γλυκερόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν βιομηχανική, διαχωρισμένη και καθαρότητας  $\sim 88,5 \%$  κατά βάρος. Παραλήφθηκε από την Agroinvest S.A. (Αχλάδι, Νομός Φθιώτιδας). Η γλυκερόλη περιείχε υπολείμματα με την εξής σύσταση: 11-12% w/w νερό, 5-6% w/w άλατα καλίου, 1% w/w ελεύθερα λιπαρά οξέα και λιγότερο από 0,2% w/w μεθανόλη.

## 2.2 Βιολογικό υλικό

Ως βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, τα στελέχη ACA-YC 5029 και ACA-YC 5032 της ζύμης *Yarrowia lipolytica*. Τα στελέχη αυτά ανήκουν στην συλλογή του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Προηγήθηκαν μελέτες οι οποίες έδειξαν την δυνατότητα παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από τα στελέχη αυτά (Papanikolaou et al., 2009; Tchakouteau et al., 2015; Papanikolaou et al., 2017). Η ανανέωση των μικροοργανισμών έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες (slants) με στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε peptone dextrin agar (PDA) σε θερμοκρασία ( $T = 6 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Για να διατηρηθεί η ζωικότητα των στελεχών, γινόταν ανανεώσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε τρεις εβδομάδες περίπου). Τρεις μέρες πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου, τα στελέχη ανανεώνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες για να βρίσκονται πάντα στην ίδια φάση της αύξησης (εκθετική φάση.)

## 2.3 Συνθήκες καλλιέργειας

### 2.3.1 Παρασκευή υγρού εμβολίου

Αρχικά για να προετοιμαστεί το εμβόλιο, έγινε αύξηση του μικροοργανισμού σε προκαλλιέργεια, η οποία πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer των 250 mL πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (μέχρι τα  $50 \pm 1$  mL) με θρεπτικό μέσο YPD (Yeast 10 g/L, Peptone 10 g/L, D-glucose 10 g/L). Έπειτα η προκαλλιέργεια τοποθετήθηκε σε ανακινούμενη τράπεζα προς επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης ( $180 \pm 5$  rpm) και θερμοκρασίας ( $28 \pm 1$  °C) για 24 ώρες. Μετά το πέρας του 24ώρου διενεργήθηκαν μικροβιολογικοί έλεγχοι σε μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί αν έχει μολυνθεί το εμβόλιο. Ύστερα η προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της κύριας καλλιέργειας κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Ο όγκος εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 mL (2% v/v εμβόλιο -  $10^5$ - $10^7$  cfu) Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλες τις πειραματικές διαδικασίες πριν από κάθε κύρια καλλιέργεια του εκάστοτε στελέχους.

### 2.3.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε ως πηγή άνθρακα και ενέργειας ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη και ήταν περιοριστικό ως προς την πηγή αζώτου. Ελήφθη υπόψη η καθαρότητα της γλυκερόλης για τους υπολογισμούς των αρχικών συγκεντρώσεων υποστρώματος στα πειράματα που έλαβαν χώρα. Η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης που προστέθηκε ήταν 70 g/L(G10l0). Στο πείραμα αναφοράς (blank) δεν προστέθηκε κατσίγαρος (YAE). Στα επόμενα πειράματα, στο θρεπτικό μέσο προστέθηκε κατσίγαρος (YAE) ως υγρό ζύμωσης προκειμένου να αραιωθεί η γλυκερόλη. Μετά την προσθήκη κατσίγαρου και νερού βρύσης σε συγκεκριμένους όγκους, στο θρεπτικό μέσο υπήρχαν αρχικές συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών (Pho) ίσες με Pho ~1 g/L, Pho ~2 g/L και Pho ~3,5 g/L (στην τελευταία περίπτωση η γλυκερόλη διαλύθηκε σε YAE και δεν προστέθηκε καθόλου νερό). Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές συνθήκες ως προς την πηγή αζώτου (Papanikolaou et al., 2001).

Συγκεκριμένα, για την πηγή άνθρακα επιλέχθηκαν οι εξής αρχικές συγκεντρώσεις:

1. 70 g/L γλυκερόλης

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου προστέθηκαν στο θρεπτικό έως ότου οι φαινολικές ουσίες σε αυτό να έχουν τις εξής συγκεντρώσεις:

1. 1 g/L
2. 2 g/L
3. 3,5 g/L

Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν:

1. 1 g/L yeast extract
2. 1 g/L peptone

Τέλος, για τα άλατα τα ακόλουθα:

1. 7 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (άνυδρο φωσφορικό κάλιο)
2. 2,5 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (άνυδρο φωσφορικό δι-νάτριο)
3. 1,5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (ένυδρο θειϊκό μαγνήσιο)
4. 0,15 g/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (ένυδρος τριχλωριούχος σίδηρος)
5. 0,15 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (ένυδρο 2- χλωριούχο ασβέστιο)
6. 0,02 g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (ένυδρος θειικός ψευδάργυρος)
7. 0,06 g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (ένυδρο θειϊκό μαγνήσιο)

### 2.3.3 Ανάλυση πειραματικών σταδίων

Η παρούσα μελέτη χωρίστηκε σε τρία πειραματικά στάδια (σειρές πειραμάτων). Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η ζύμωση των δύο στελεχών, χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου (YAE) σε υπόστρωμα γλυκερόλης συγκέντρωσης 70 g/L, η οποία αποτέλεσε την ζύμωση αναφοράς για τις υπόλοιπες ζυμώσεις (blank).

Στη συνέχεια σε δεύτερο στάδιο ακολούθησαν ζυμώσεις και για τα δύο στελέχη με προσθήκη YAE μέχρις ότου στην καλλιέργεια η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (Pho) να είναι ίση με 1, 2 και 3,5 g/L αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες που διενεργήθηκαν καθώς και η διάρκεια ζύμωσης της κάθε μίας παρατίθενται στους πίνακες 2.1 και 2.2.

Εκτός από τις ζυμώσεις βυθού σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer, πραγματοποιήθηκε σε τρίτο στάδιο και μία ζύμωση (fed-batch) σε βιοαντιδραστήρα (New Brunswick

Scientific, USA) όγκου 4 L και ενεργού όγκου 2 L. Παρασκευάστηκε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο προστέθηκε στον βιοαντιδραστήρα ο οποίος τοποθετήθηκε στο αυτόκαυστο για αποστείρωση. Το εμβόλιο προστέθηκε στο αποστειρωμένο πλέον υγρό θρεπτικό μέσο ασηπτικά με χρήση περισταλτικής αντλίας. Η ποσότητα του εμβολίου ήταν 10% επί του ενεργού όγκου του βιοαντιδραστήρα. Έπειτα, ο βιοαντιδραστήρας τέθηκε σε λειτουργία με ταχύτητα ανάδευσης 500 rpm και αερισμό 1 vvm. Η θερμοκρασία, στην οποία τελέστηκε η ζύμωση, ήταν  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Για την ημισυνεχή τροφοδοτούμενη ζύμωση (fed-batch), επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC- 5032, γιατί συγκριτικά με το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC- 5029 παρήγαγε περισσότερες ποσότητες πολυολών και κιτρικού οξέος σε όλες τις συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών. Τα πειράματα στον βιοαντιδραστήρα έγιναν σε αρχικές συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών Pho 0,0 g/L και Pho 3,5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν  $\sim 70$  g/L και, μόλις έφθασε περίπου τα  $\sim 10$  g/L, ξεκίνησε η εξωτερική τροφοδοσία γλυκερόλης, η οποία έγινε με πυκνό διάλυμα γλυκερόλης. Η συγκέντρωση της γλυκερόλης βρέθηκε να είναι  $\sim 50$  g/L μετά την τροφοδοσία. Το pH κατά την διάρκεια των ζυμώσεων διορθωνόταν με πυκνό διάλυμα βάσης NaOH έως ότου η τιμή του φτάσει γύρω στο 6.

**Πίνακας 2.1:** Οι καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης, ανά στέλεχος, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών.

Στελέχη	<i>Y.lipolytica</i> ACA-YC-5029	<i>Y.lipolytica</i> ACA-YC-5032
<b>Κωνικές φιάλες (250mL) με 70 g/L γλυκερόλης</b>		
Pho=0,0 g/L	✓	✓
Pho=1 g/L	✓	✓
Pho=2 g/L	✓	✓
Pho=3,5 g/L	✓	✓
<b>βιοαντιδραστήρας (4 L)</b>		
Pho=0,0 g/L		✓
Pho=3,5 g/L		✓

**Πίνακας 2.2:** Η διάρκεια σε ώρες (h) κάθε ζύμωσης, στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών.

Στελέχη	<i>Y.lipolytica</i> ACA-YC-5029	<i>Y.lipolytica</i> ACA-YC-5032
<b>Κωνικές φιάλες (250mL) με 70 g/L γλυκερόλης</b>		
Pho=0,0 g/L	312h	240h
Pho=1 g/L	241h	241h
Pho=2 g/L	242h	242h
Pho=3,5 g/L	240h	240h
<b>βιοαντιδραστήρας (4 L)</b>		
Pho=0,0 g/L (ημισυνεχής)		199h
Pho=0,0 g/L (ασυνεχής)		97 h
Pho=3,5 g/L (ασυνεχής)		166.5h

## 2.4 Αναλύσεις

### 2.4.1 Προσδιορισμός και διόρθωση του pH στο μέσο αύξησης της ζύμης

Για τον προσδιορισμό του pH στο υγρό της ζύμωσης χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο (pH /mV meter HI 8014-Hanna Instruments). Στην περίπτωση που η μετρηθείσα τιμή του pH ήταν κοντά στο επιθυμητό εύρος τιμών ~6 δεν γινόταν καμία ενέργεια, διαφορετικά διορθωνόταν η τιμή του pH, στις υπόλοιπες κωνικές φιάλες της καλλιέργειας, με κατάλληλη προσθήκη αποστειρωμένου διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 5M (Sarris et al., 2011).

### 2.4.2 Προσδιορισμός βιομάζας

Αρχικά το υγρό ζύμωσης παραλαμβάνεται από σε falcon tube και φυγοκεντρείται σε τύπου Universal 320R Hettich Centrifuge για 10 λεπτά, στις 9000 στροφές και στους 4°C, προκειμένου να διαχωριστεί η βιομάζα από το υπερκείμενο υγρό. Ακολουθεί έκπλυση με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια δεύτερη φυγοκέντριση υπό τις ίδιες συνθήκες. Η νωπή βιομάζα ύστερα, μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια

McCartney, τα οποία τοποθετούνται σε φούρνο τύπου Gallenkamp oven BS OV-160 προς ξήρανση στους 70°C για 72 ώρες. Τέλος, μετά την ξήρανση, το φιαλίδιο ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό τύπου KERN EW 420-3NM και από την διαφορά του βάρους υπολογιζόταν η παραγόμενη βιομάζα εκφραζόμενη σε g/L.

### **2.4.3 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)**

Σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν, μετρηθήκαν ποσοτικά οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες, με μία διαδικασία βασισμένη σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου, το οποίο προτάθηκε από τους Liang et al., (2009).

Για τον προσδιορισμό των ενδοπολυσακχαριτών αρχικά παραλαμβάνονται 0,05 g ξηρής βιομάζας, τα οποία τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Ύστερα γίνεται προσθήκη 10 ml υδροχλωρικού οξέως (HCl) συγκέντρωσης 2M και ακολουθεί υδρόλυση του διαλύματος στους 100°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 ml υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 2M, προκειμένου να γίνει εξουδετέρωση και ακολουθεί διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί με στόχο να απομακρυνθεί η βιομάζα και το διήθημα να καταστεί διαυγές.

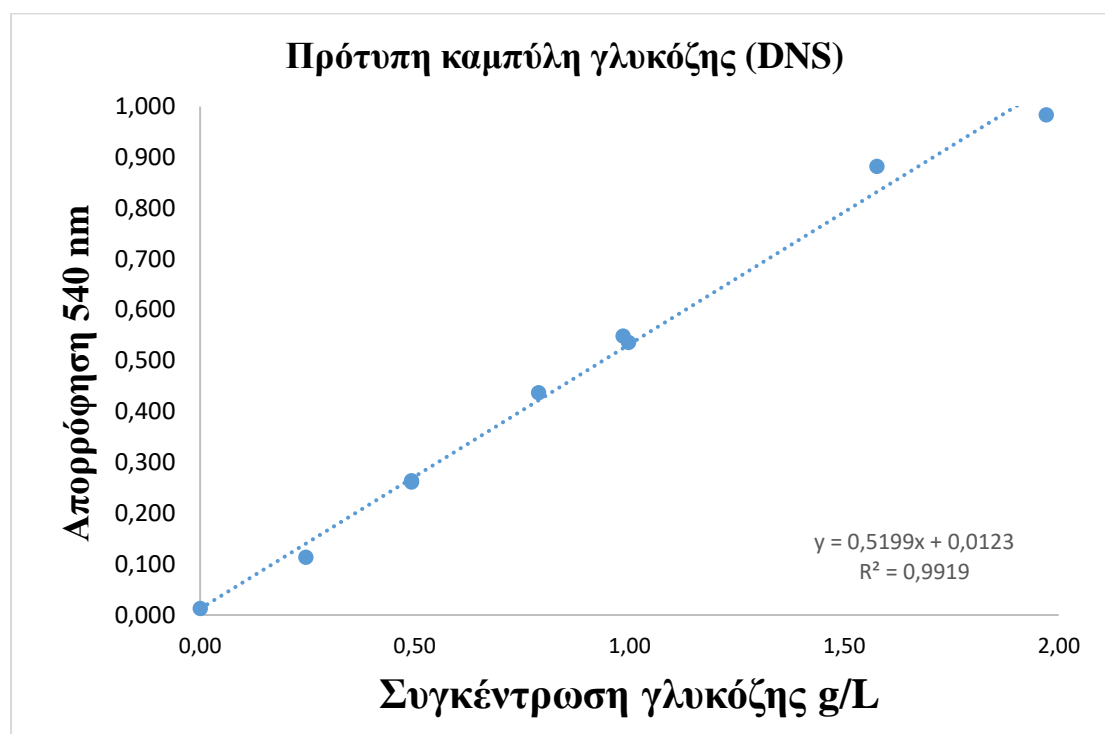
Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδοπολυσακχαριτών εφαρμόστηκε η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων με χρήση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959).

### **2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών έγινε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Αρχικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται 0,5 ml αντιδραστηρίου DNS και 0,5 ml δείγματος, ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος σε κυκλοαναμκτήρα (vortex) και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 100°C για 5 λεπτά ακριβώς. Έπειτα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται να κρυώσουν και προστίθενται 5 ml απιονισμένου νερού και μετά από ανάδευση του διαλύματος ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.



Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων (γλυκόζης) στα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης (g/L) για τους ενδοπολυσακχαρίτες (Γράφημα 2.1).



Γράφημα 2.1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλυκόζης

#### 2.4.5 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Για την εκχύλιση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του ενδοκυτταρικού λίπους ακολουθήθηκαν τα παρακάτω πειραματικά βήματα:

1. Αρχικά στο φιαλίδιο McCartney μέσα στο οποίο βρίσκεται η ξηρή βιομάζα, προστίθενται  $25 \pm 2$  ml από μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης σε αναλογία  $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH}$  2:1. (Folch et al., 1957). Για να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών οξέων του λίπους, το φιαλίδιο McCartney φυλάσσεται κλεισμένο αεροστεγώς στο σκοτάδι για 72 ώρες με στόχο την εκχύλιση του λίπους.
2. Στη συνέχεια γίνεται διήθηση του περιεχόμενου του φιαλιδίου σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη για απομάκρυνση της βιομάζας.

3. Ακολουθεί εξάτμιση υπό κενό του διηθήματος στους 40°C, με την βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα τύπου Flash Evaporator- Rotavapor R -114, ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και να παραμείνει στην σφαιρική φιάλη μόνο το μικροβιακό λίπος.
4. Τέλος, η σφαιρική φιάλη ζυγίζεται με την βοήθεια ζυγού ακριβείας και από την διαφορά μάζας υπολογίζεται το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος σε g/L.

#### **2.4.6 Μεθυλεστεροποίηση**

Επειδή τα λιπαρά υλικά δεν είναι ιδιαίτερα πτητικά, είναι απαραίτητη η μετατροπή τους στους αντίστοιχους πτητικούς μεθυλικούς εστέρες (FAMES), προκειμένου να αναλυθούν μέσω αεριοχρωματογραφίας (GC), ώστε να γίνει ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων με τη γενικευμένη μέθοδο AFNOR (Paranikolaou et al., 2001). Αρχικά η εστεροποίηση τελείται σε αλκαλικό περιβάλλον και κατόπιν σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο, τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Ταυτόχρονα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα μεθανολικού νατρίου και προκύπτουν οι αντίστοιχοι σάπωνες. Στο δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

Στις σφαιρικές φιάλες που έχουν παραληφθεί από την ανάλυση του ποσοτικού προσδιορισμού του ενδοκυτταρικού λίπους, προστίθενται 1-2 πέτρες βρασμού και 10 ml μεθανολικού νατρίου. Το δείγμα φέρεται σε βρασμό για 20 λεπτά, ενώ έχει τοποθετηθεί κάθετος ψυκτήρας. Μετά το πέρας των 20 λεπτών προστίθεται υδροχλωρική μεθανόλη μέχρι να αποχρωματιστεί το δείγμα και ακολουθεί βρασμός για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται νερό για να τερματιστεί η αντίδραση και το δείγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη. Προστίθενται 6 ml εξανίου και, αφού το δείγμα αναδευτεί έντονα, αφήνεται σε ηρεμία προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός των δύο φάσεων. Η κατώτερη φάση, που είναι η υδατική, απορρίπτεται και συλλέγεται η επιπολάζουσα φάση, η οποία περιλαμβάνει τους μεθυλεστέρες σε φιαλίδιο, στο οποίο προστίθεται άνυδρο θειικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) για απορρόφηση της υγρασίας. Τέλος, το δείγμα οδηγείται στον αέριο χρωματογράφο για ανάλυση.

#### 2.4.7 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC)

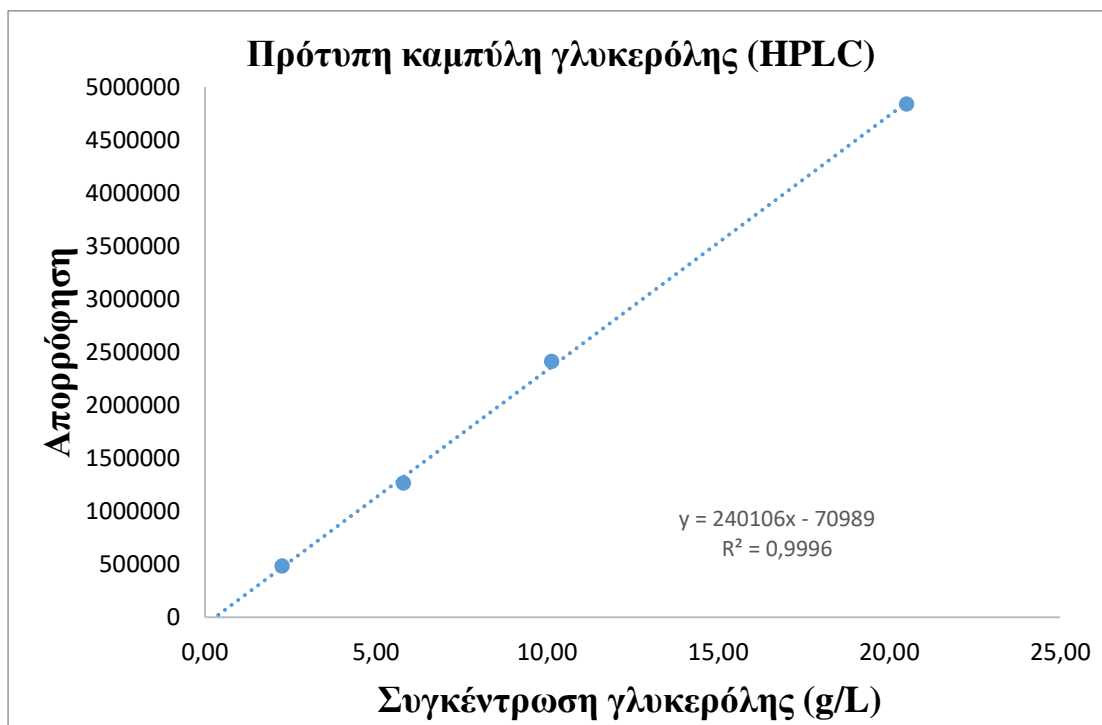
Προκειμένου να γίνει ο ποιοτικός προσδιορισμός της σύστασης του μικροβιακού λίπους, στα επιμέρους λιπαρά οξέα χρησιμοποιήθηκε αεριοχρωματογράφος Fisons GC8000 εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη CPWAX 52 CB μήκους 30 m και με ανιχνευτή FID (Flame Ionization Detector). Το φέρον αέριο ήταν το He, του οποίου η ροή ήταν 2 ml/min (25°C). Στον εισαγωγέα του αεριοχρωματογράφου με την βοήθεια σύριγγας εγχύεται 1 μL δείγματος.

Με την βοήθεια πρότυπων μεθυλεστέρων των βασικότερων λιπαρών οξέων έγινε η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων, αντιστοιχίζοντας τους χρόνους κατακράτησης τους ( $t_R$ ). Το % ποσοστό κάθε λιπαρού οξέος υπολογίστηκε με βάση το εμβαδό της κάθε κορυφής στα χρωματογραφήματα με την βοήθεια του τύπου:

$$\% \text{ Λ. Ο} = \left( \frac{\text{Εμβαδό Λ.Ο}}{\text{Συνολικό εμβαδό}} \right) \times 100$$

#### 2.4.8 Ανάλυση με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της γλυκερόλης, του κιτρικού οξέος και των πολυολών (αραβιτόλης, μαννιτόλης, ερυθριτόλης), σε δείγματα με υγρό της ζύμωσης, έγινε με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Χρησιμοποιήθηκε χρωματογράφος Waters Association 600E εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη Phenomenex Rezex ROA 30.0 cm × 7.8. Η στήλη αυτή με την οποία έγινε ο διαχωρισμός, διαθέτει συνδυασμό ανιχνευτών και UV (Waters 486) και RI (RI; Waters 410). Ως κινητή φάση (mobile phase) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θειϊκού οξέος H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM με ρυθμό ροής (flow rate) 0,6 mL/min σε θερμοκρασία T=65 °C και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 24 λεπτά. Η γλυκερόλη και οι πολυόλες ανιχνεύτηκαν από τον RI ανιχνευτή ενώ το κιτρικό οξύ από τον UV ανιχνευτή. Το κιτρικό οξύ υπερκτιμάται από τον UV ανιχνευτή (λόγω συνεκτίμησης και του ισο-κιτρικού οξέος) κατά ~5-10% και υπολογίζεται μέσω ενζυμικού προσδιορισμού ακριβέστερα. Η εύρεση των άγνωστων συγκεντρώσεων των προαναφερθέντων ενώσεων έγινε με την χρήση των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς των πρότυπων ουσιών. Στο γράφημα 2.2 που ακολουθεί φαίνεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς της γλυκερόλης.



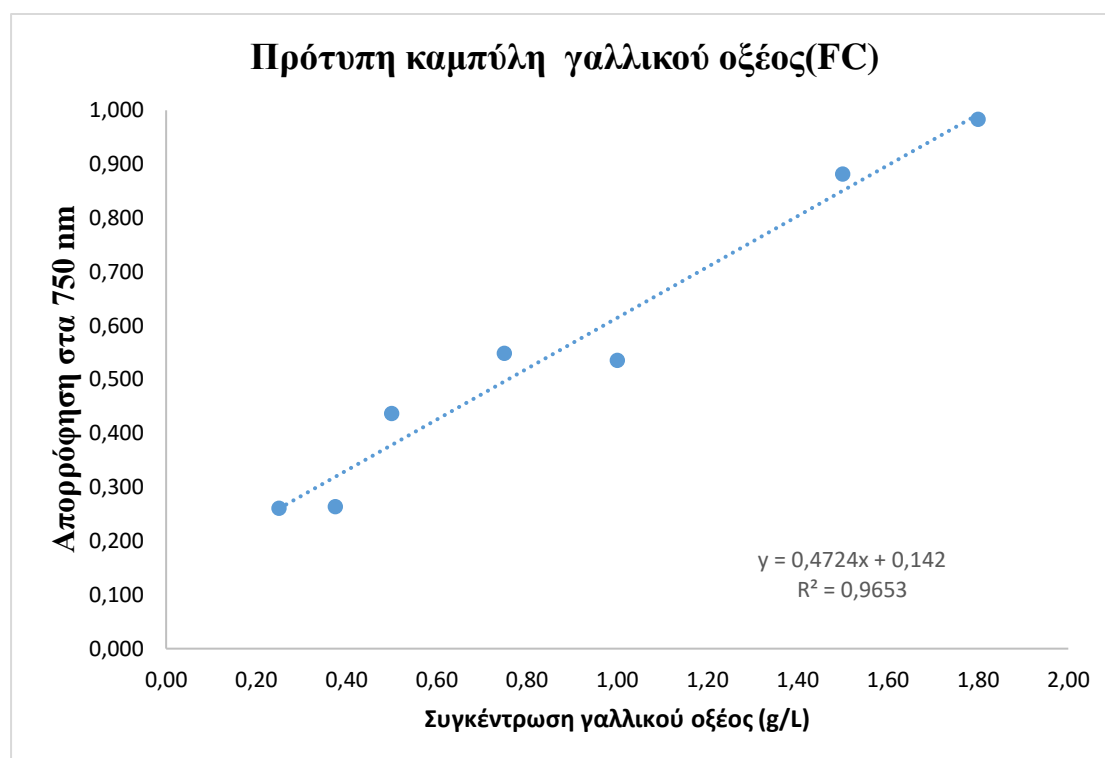
**Γράφημα 2.2:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλυκερόλης

#### 2.4.9 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ουσιών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των φαινολικών ουσιών στο υγρό της ζύμωσης, έγινε με την μέθοδο Folin–Ciocalteu. Πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων των ΥΑΕ από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) και φωσφο-βολφραμικά ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξείδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου ( $W_8O_{23}$ ) και του μολυβδαινίου ( $Mo_8O_{23}$ ). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα  $Na_2CO_3$ . Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τον δείκτη Folin-Ciocalteu εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Slinkard and Singleton, 1997).

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ουσιών στο δείγμα ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Αρχικά σε δοκιμαστικό σωλήνα, ύστερα απο κατάλληλη αραιώση, τοποθετήθηκαν 0,2 mL απο δείγμα με υγρό της ζύμωσης, 10,8 mL απιονισμένο νερό, 8 mL διαλύματος άνυδρου ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 75 g/L) και 1 mL αντιδραστηρίου FC.
2. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 750 nm με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου Hitachi U-2000.
3. Η εύρεση των άγνωστων συγκεντρώσεων των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα έγινε με χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (g/L) όπως φαίνεται και στο γράφημα 2.1 που ακολουθεί.



**Γράφημα 2.4:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

## 2.4.10 Μελέτη αποχρωματισμού

Ακολουθήθηκε πρωτόκολλο αποχρωματισμού (Sayadi and Ellouz, 1992) για να εξεταστεί η δυνατότητα των στελεχών της *Yarrowia lipolytica* να αποχρωματίζουν το υγρό της ζύμωσης. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 395 nm με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου Hitachi U-2000, δειγμάτων του υγρού της ζύμωσης αφού πρώτα είχε διορθωθεί το pH τους σε εύρος 6,0-6,3 και είχαν αραιωθεί κατά 30 φορές. Το ποσοστό αποχρωματισμού μετρήθηκε με την παρακάτω σχέση:

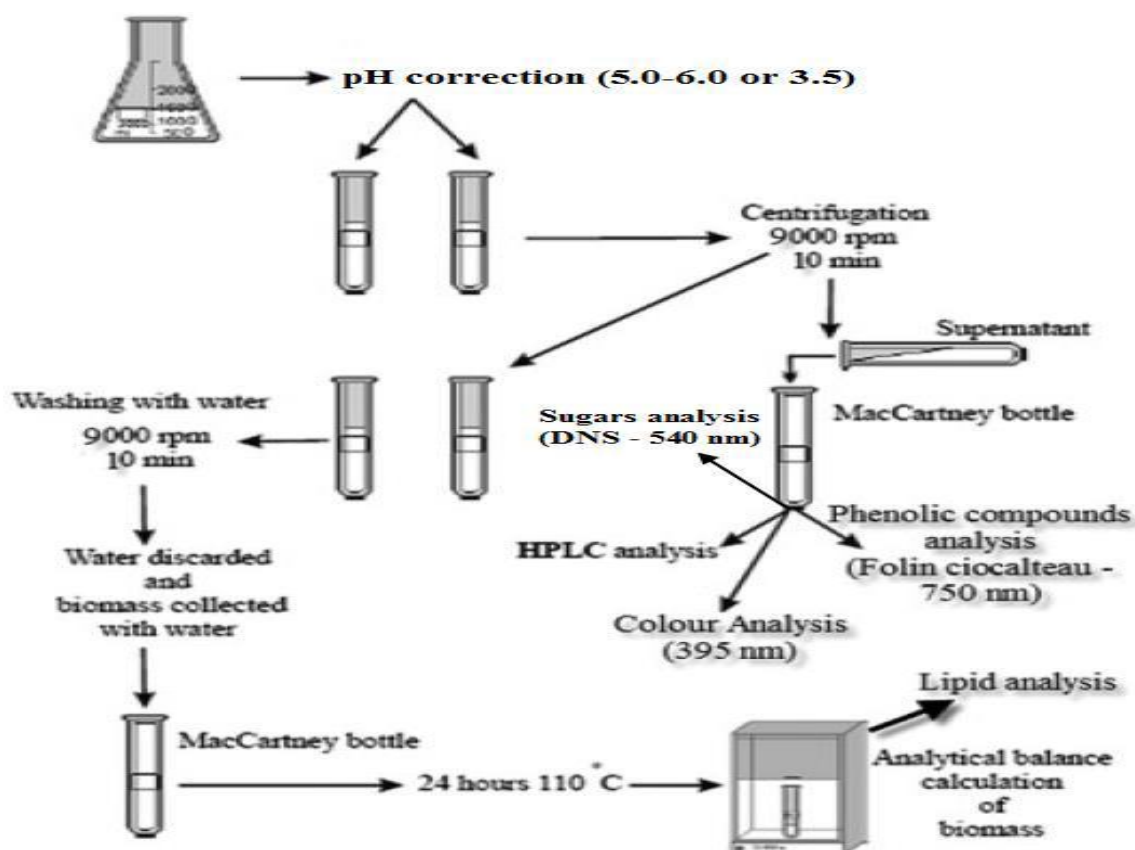
$$\% \text{ Αποχρωματισμός} = [(A_{\text{αρχ.}} - A_t) / A_0] \times 100$$

όπου:

$A_{\text{αρχ.}}$ : απορρόφηση του δείγματος υγρού της ζύμωσης στις 0 ώρες (ακριβώς πριν τον εμβολιασμό)

$A_t$ : απορρόφηση του δείγματος υγρού της ζύμωσης σε t ώρες μετά τον εμβολιασμό

Στην Εικόνα 2.1 που ακολουθεί απεικονίζονται σε διάγραμμα ροής οι μέθοδοι ανάλυσης στα πειράματα που διενεργήθηκαν.



**Εικόνα 2.1:** Διαγράμμα ροής που απεικονίζει τις μεθόδους ανάλυσης στα πειράματα που διενεργήθηκαν.

### **3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η ικανότητα των στελεχών *Yarrowia lipolytica* ACA- YC 5029 και *Yarrowia lipolytica* ACA- YC 5032 να αναπτύσσονται σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) και γλυκερόλη, με σκοπό την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (κιτρικό οξύ, πολυόλες, ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες και λιπίδια). Ερευνήθηκε επίσης η δυνατότητα χρήσης των συγκεκριμένων στελεχών ζύμης για βιαπορρύπανση (αποφαινόλωση- αποχρωματισμός) του υγρού καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε για την μικροβιακή ζύμωση.

Στην ενότητα αυτή παρατίθενται όλα τα πειραματικά αποτελέσματα, όπως αυτά συλλέχθηκαν από την μελέτη της κινητικής όλων των ζυμώνσεων, καθώς και τα πειραματικά αποτελέσματα από όλες τις αναλύσεις που διενεργήθηκαν.

Από κάθε ζύμωση και για κάθε στέλεχος μετρήθηκαν τα εξής δεδομένα:

- Το pH του υγρού καλλιέργειας
- Η καταναλωθείσα πηγή άνθρακα δηλαδή της γλυκερόλης (GIol, g/L)
- Η παραγωγή βιομάζας (X, g/L)
- Η παραγωγή μικροβιακού λίπους (L, g/L)
- Η παραγωγή πολυολών (μαννιτόλης,ερυθριτόλης, αραβιτόλης) και κιτρικού οξέος (Man, Ery, Ara, Cit, g/L)
- Η παραγωγή ενδοπλυσακχαριτών (IPS, g/L)
- Το ποσοστό αποφαινόλωσης
- Το ποσοστό αποχρωματισμού

Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των παρακάτω παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης:

- Συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου κιτρικού οξέος ( $Y_{Cit/s}$ ) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).
- Συντελεστής απόδοσης των παραγόμενων πολυολών μαννιτόλης ( $Y_{Man/s}$ ), ερυθριτόλης ( $Y_{Ery/s}$ ) και αραβιτόλης αντίστοιχα ( $Y_{Ara/s}$ ) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).
- Το παραγόμενο λίπος ( $Y_{L/x}$ ) ως προς την ξηρά βιομάζα (g/g).
- Συντελεστής απόδοσης βιομάζας ( $Y_{x/s}$ ) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).



- Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ως προς την παραχθείσα βιομάζα ( $Y_{PS/x}$ ) (g/g).

Πραγματοποιήθηκε αρχικά η ζύμωση των δύο στελεχών, χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου (YAE) σε υπόστρωμα γλυκερόλης, η οποία αποτέλεσε την ζύμωση αναφοράς για τις υπόλοιπες ζυμώσεις (blank). Στη συνέχεια ακολούθησαν ζυμώσεις και για τα δύο στελέχη με προσθήκη κατσίγαρου μέχρις ότου στην καλλιέργεια η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (Pho) να είναι ίση με 1, 2 και 3,5 g/L αντίστοιχα. Στο τρίτο στάδιο επιλέχθηκε το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 για ζύμωση τύπου batch και fed-batch σε βιοαντιδραστήρα (3L).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του παραγόμενου λίπους με την βοήθεια της αεριοχρωματογραφίας, καθώς και υπολογισμός του ποσοστού τους. Σε κάθε ζύμωση ερευνήθηκε το ποσοστό αποφαινώσεως και αποχρωματισμού.

### **3.1 Συγκριτική αξιολόγηση των δύο στελεχών σε κωνικές φιάλες ( $S_0=70$ g/L γλυκερόλης) χωρίς προσθήκη υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (Pho=0 g/L)**

Στο πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις και των δύο στελεχών (*Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029, *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032) χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου (YAE) σε υπόστρωμα γλυκερόλης ( $S_0=70$  g/L). Τα ευρήματα του πρώτου σταδίου της πειραματικής διαδικασίας, που προέκυψαν από τους υπολογισμούς των παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης και αποτέλεσαν σημείο αναφοράς για τις υπόλοιπες ζυμώσεις είναι η μέγιστη παραγωγή βιομάζας, η μέγιστη παραγωγή πολυολών και κυρίως μαννιτόλης, η μέγιστη παραγωγή λίπους, η μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος και η μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών. Στους πίνακες 3.1 και 3.2 που ακολουθούν, παρατίθενται αναλυτικά οι μέγιστες τιμές των στοιχείων των κινητικών που παρατηρήθηκαν και για τα δύο στελέχη σε ζύμωση χωρίς προσθήκη κατσίγαρου (blank).

**Πίνακας 3.1:** Κινητικά δεδομένα των στελεχών *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 σε ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης ~70 g/L και χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου (blank) , υπό συνθήκες περιοριστικές σε N.

<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5029														
Pho (g/L)	t (h)	X (g/L)	L (g/L)	Glccons (g/L)	Cit (g/L)	Man (g/L)	Ara (g/L)	Ery (g/L)	Y <sub>X/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>L/X</sub> % (w/w)	Y <sub>Cit/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>Man/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>Ara/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>Ery/Glc</sub> (g/g)
	144β	11,0	<b>2,0</b>	56,6	6,3	2,1	1,2	3,5	0,19	<b>18,5</b>	0,11	0,04	0,02	0,06
	191α,ε	<b>12,3</b>	1,4	60,7	22,8	7,3	3,9	9,7	0,20	11,5	0,38	0,12	0,06	0,16
0,00	215στ	12,0	1,1	61,4	24,3	7,9	3,1	9,8	0,20	9,2	0,40	0,13	0,05	0,16
	240δ	12,3	1,2	66,8	31,1	11,2	3,9	3,6	0,18	9,8	0,47	0,17	0,06	0,05
	312γ	12,0	0,6	66,8	<b>40,2</b>	6,8	3,0	0,0	0,18	5,2	<b>0,60</b>	0,10	0,05	0,00

**Πίνακας 3.2:** Κινητικά δεδομένα των στελεχών *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 σε ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης ~70 g/L και χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου (blank) , περιοριστικές σε N.

<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5032														
Pho (g/L)	t (h)	X (g/L)	L (g/L)	Glccons (g/L)	Cit (g/L)	Man (g/L)	Ara (g/L)	Ery (g/L)	Y <sub>X/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>L/X</sub> % (w/w)	Y <sub>Cit/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>Man/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>Ara/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>Ery/Glc</sub> (g/g)
	97β	9,5	1,6	42,53	8,2	6,7	2,6	8,5	<b>0,28</b>	16,5	0,33	<b>0,22</b>	<b>0,22</b>	<b>0,25</b>
	168ε	10,2	1,0	63,8	20,2	12,1	<b>4,1</b>	10,3	0,16	9,8	0,41	0,20	0,20	0,24
0,00	191στ	11,0	1,4	66,83	24,1	11,1	3,9	<b>11,4</b>	0,17	12,5	0,43	0,21	0,21	0,21
	215α	11,3	1,2	66,83	26,6	10,9	3,1	7,4	0,17	10,5	0,40	0,16	0,16	0,11
	240γ,δ	8,6	0,9	66,83	31,4	<b>12,1</b>	3,8	3,6	0,13	10,5	0,47	0,18	0,18	0,05

Όπου t(h): χρόνος ζύμωσης, X(g/L): βιομάζα, L (g/L): λίπος, Glccons (g/L): Καταναλωθείσα ποσότητα γλυκερόλης, Cit (g/L): κιτρικό οξύ, Man (g/L): μαννιτόλη, Ara (g/L): αραβιτόλη, Ery (g/L): ερυθριτόλη, Y<sub>X/Glc</sub> (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής βιομάζας προς καταναλωθείσα ποσότητα γλυκερόλης, Y<sub>L/X</sub> % (w/w): συντελεστής απόδοσης παραγωγής λίπους προς παραγόμενη ποσότητα βιομάζας επί της 100, Y<sub>Cit/Glc</sub> (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος προς ποσότητα καταναλωθείσας

γλυκερόλης,  $Y_{\text{Man/Glcl}}$  (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής μαννιτόλης προς ποσότητα καταναλωθείσας γλυκερόλης,  $Y_{\text{Ara/Glcl}}$  (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής αραβιτόλης προς ποσότητα καταναλωθείσας γλυκερόλης,  $Y_{\text{Ery/Glcl}}$  (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής ερυθριτόλης προς ποσότητα καταναλωθείσας γλυκερόλης.

<sup>a</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

<sup>b</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

<sup>γ</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος (g/L).

<sup>δ</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης (g/L).

<sup>ε</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης (g/L).

<sup>στ</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή ερυθριτόλης (g/L).

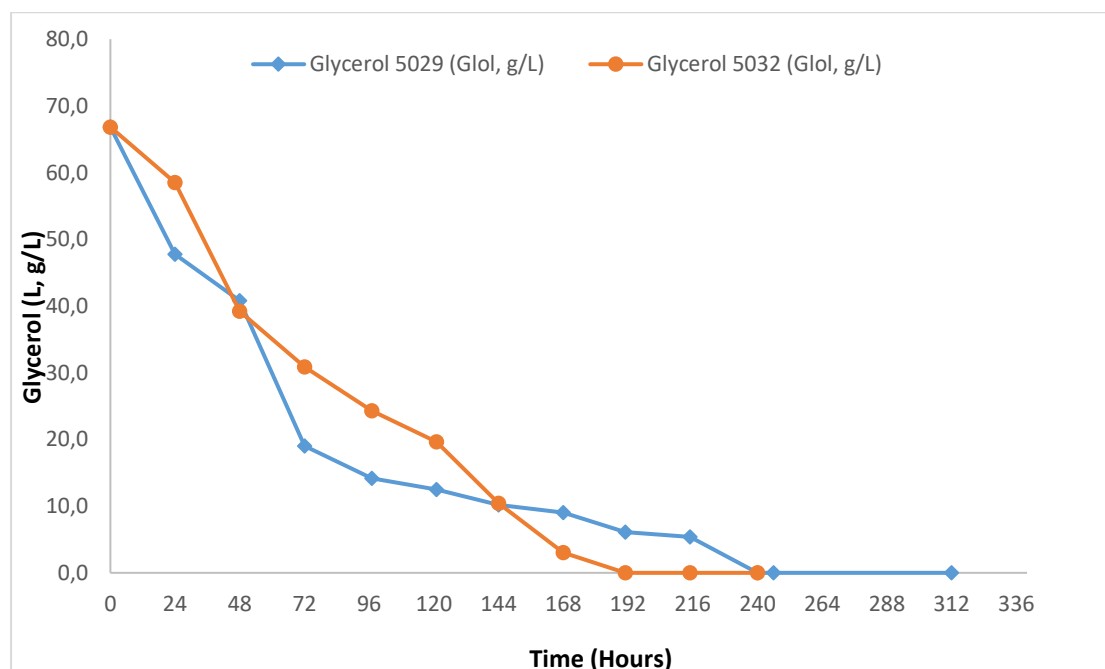
\*Μετρήθηκαν οι ενδοπολυσακχαρίτες (δεν απεικονίζονται στον παραπάνω πίνακα) και η παραγωγή τους κυμαίνεται σε ποσοστό ~23-31% βάρους κατά βάρους ξηρής βιομάζας.

- Τα δύο στελέχη που επιλέχθηκαν για τις ζυμώσεις έδειξαν ικανοποιητική ανάπτυξη. Σε όλες τις ζυμώσεις η πηγή υποστρώματος αφομοιώθηκε πλήρως. Η αφομοίωση της γλυκερόλης έγινε για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 στις 240 ώρες ζύμωσης, ενώ για το *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 έγινε ταχύτερα στις 191 ώρες ζύμωσης.
- Και στα δύο στελέχη παρατηρείται σημαντική παραγωγή βιομάζας. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρείται στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 στις 191 ώρες (12,3 g/L).
- Στο ίδιο στέλεχος παρατηρείται και η μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών στις 240 ώρες (3,3 g/L) καθώς και η μέγιστη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους στις 144 ώρες (2,0 g/L) με σχετικό συντελεστή απόδοσης μικροβιακού λίπους ως προς την βιομάζα 18,50 %. Και σε αυτήν την μελέτη διαπιστώνεται ότι τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν δεν παρουσιάζουν σημαντική ελαιογόνο ικανότητα όταν καλλιεργούνται σε υπόστρωμα γλυκερόλης με περιοριστικό στοιχείο αύξησης το άζωτο (Papanikolaou et al., 2009; Papanikolaou and Aggelis, 2010; Athenaki et al., 2018; Carsanba et al., 2018).
- Ως προς την παραγωγή πολυολών και τα δύο στελέχη εμφανίζουν σχετική ικανότητα παραγωγής πολυολών αλλά οι μέγιστες τιμές τους παρατηρούνται στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032. Η μαννιτόλη παρουσιάζει μέγιστη τιμή στις 240 ώρες (12,1 g/L), η αραβιτόλη στις 168 ώρες (4,1 g/L) και η ερυθριτόλη στις 191 ώρες ζύμωσης (11,4 g/L). Οι μεγαλύτεροι συντελεστές

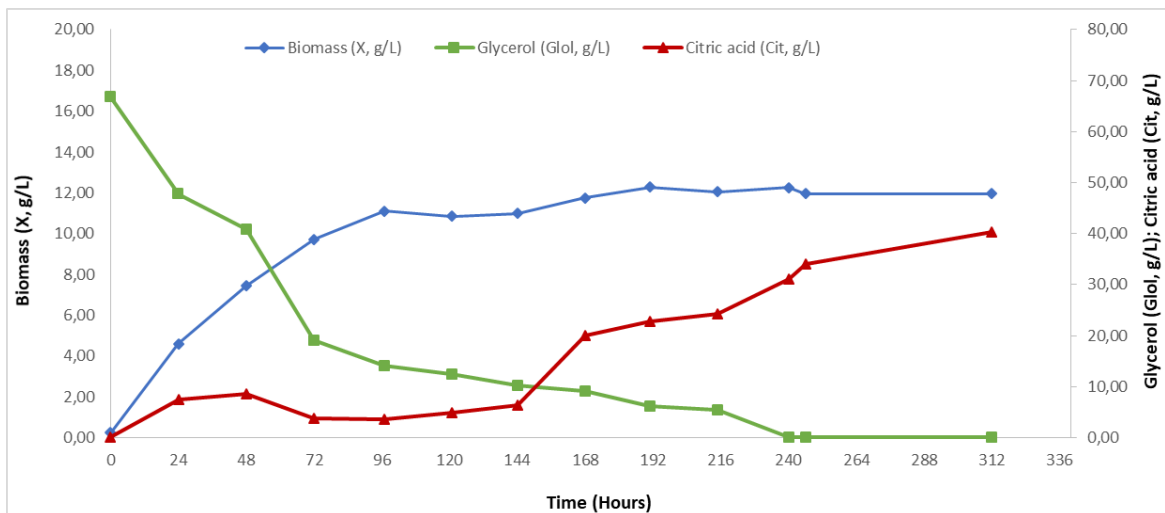
απόδοσης παραγωγής πολυολών προς την καταναλωθείσα ποσότητα γλυκερόλης εμφανίζονται επίσης στο ίδιο στέλεχος.

- Η μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος παρουσιάζεται στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 στις 312 ώρες, στο τέλος της ζύμωσης (40,2 g/L) και συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος προς καταναλωθέν υπόστρωμα ( $Y_{Cit/Glcl}$ ) 0,60 g/g.
- Απο τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 συσσωρεύει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικά προϊόντα (ενδο-πολυσακχαρίτες, λιπίδια). Αντιθέτως στο *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 παράγονται σε μεγαλύτερες ποσότητες οι πολυόλες, με την μαννιτόλη να παράγεται σε σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έναντι της αραβιτόλης και της ερυθριτόλης.

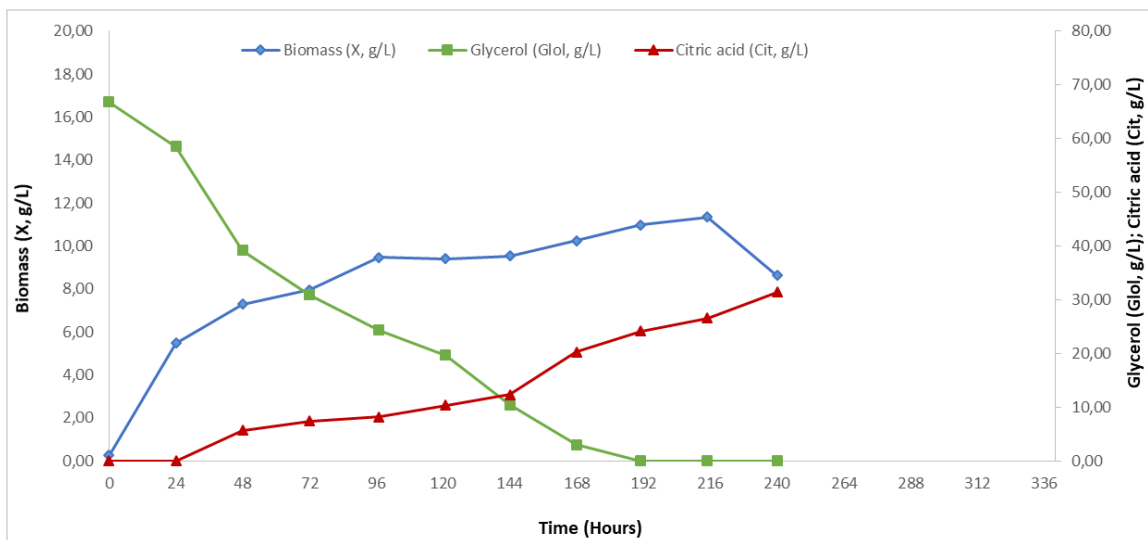
Ακολουθούν τα διαγράμματα της κατανάλωσης της γλυκερόλης, της μεταβολής της βιομάζας, της μεταβολής του μικροβιακού λίπους, του κιτρικού οξέος και των πολυολών σε συνάρτηση με τον χρόνο, για τις ζυμώσεις βυθού που πραγματοποιήθηκαν.



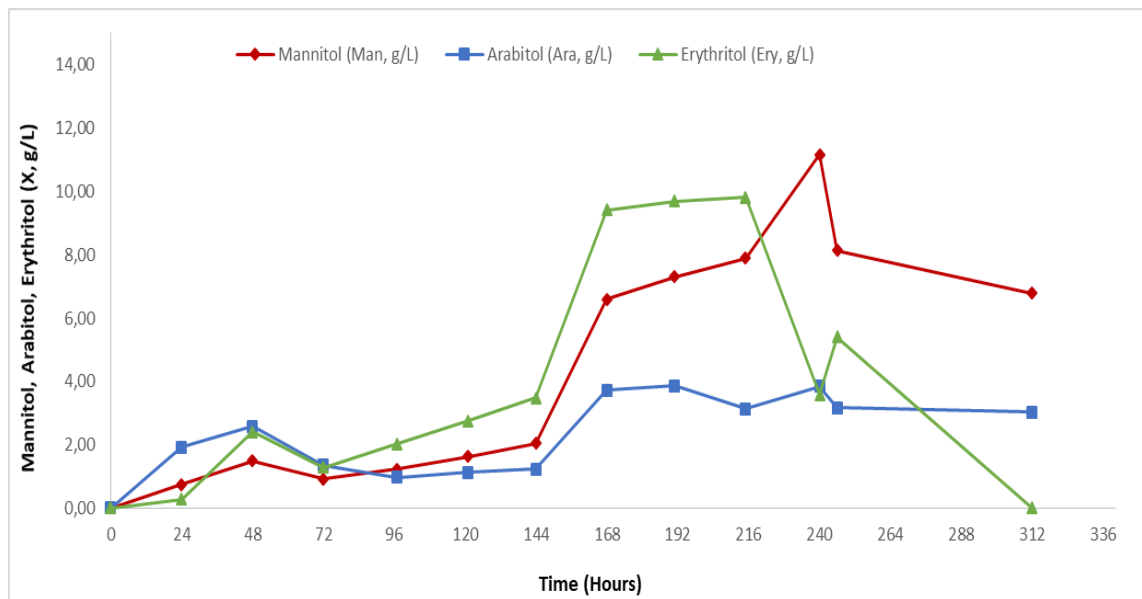
**Γράφημα 3.1α):** Κινητικά δεδομένα των δύο στελεχών με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση αναφοράς).



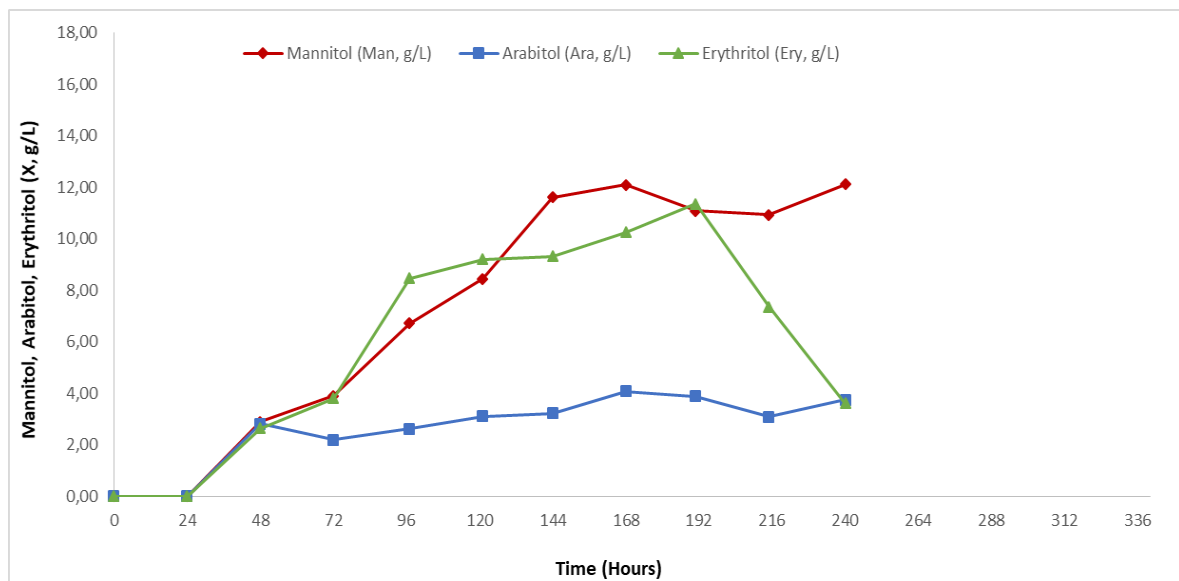
**Γράφημα 3.1β):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης, την μεταβολή της βιομάζας και του κιτρικού οξέος ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση αναφοράς).



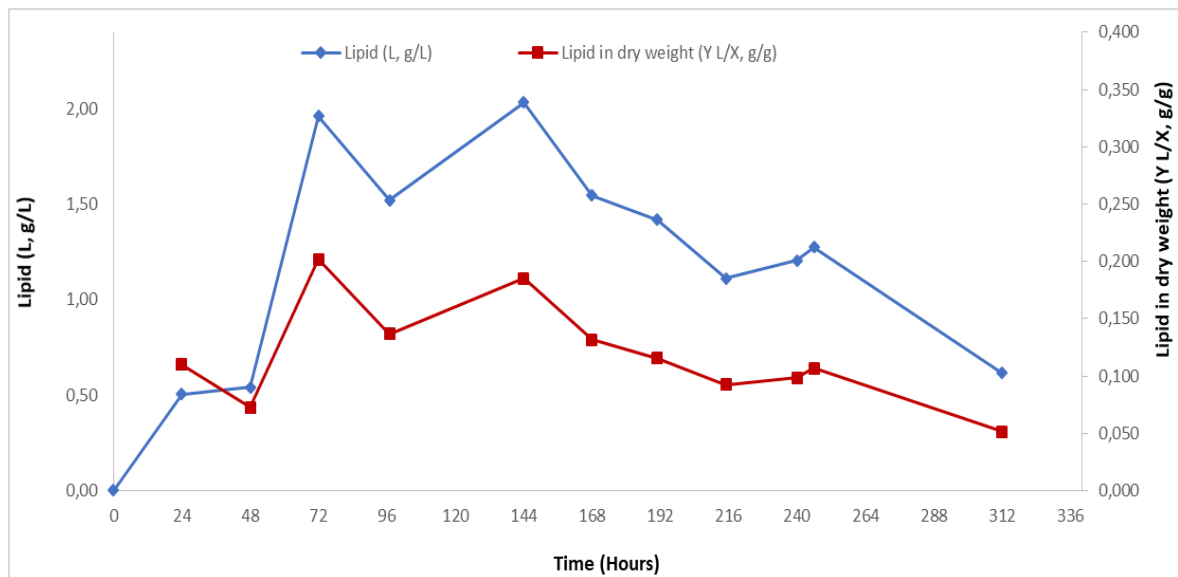
**Γράφημα 3.1γ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης, την μεταβολή της βιομάζας και του κιτρικού οξέος ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση αναφοράς).



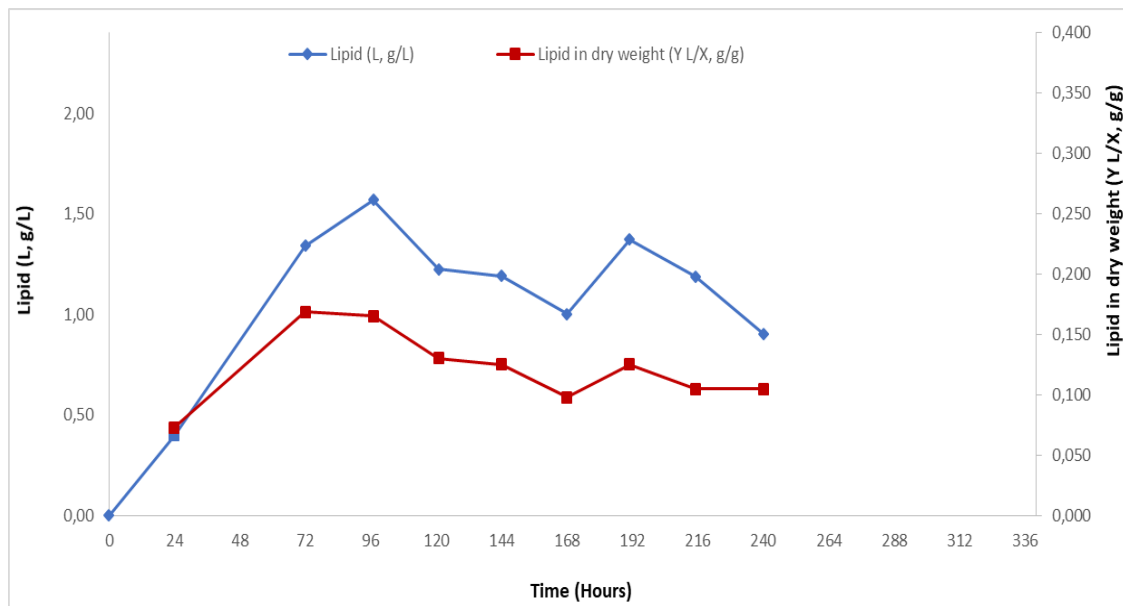
**Γράφημα 3.1δ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή της παραγόμενης μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση αναφοράς).



**Γράφημα 3.1ε):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή της παραγόμενης μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση αναφοράς).



**Γράφημα 3.1στ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή του παραγόμενου μικροβιακού λίπους και του συντελεστή απόδοσης λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα, ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση αναφοράς).



**Γράφημα 3.1ζ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή του παραγόμενου μικροβιακού λίπους και του συντελεστή απόδοσης λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα, ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση αναφοράς).

### 3.2 Συγκριτική αξιολόγηση των δύο στελεχών σε κωνικές φιάλες ( $S_0=70$ g/L γλυκερόλης) με προσθήκη υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου σε συγκεντρώσεις φαινολικών Pho=1 gr/L, Pho=2 gr/L και Pho=3,5 gr/L.

Στο δεύτερο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις και των δύο στελεχών (*Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029, *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032) με την προσθήκη κατσίγαρου (ΥΑΕ) σε υπόστρωμα γλυκερόλης ( $S_0=70$  g/L), μέχρις ότου στην καλλιέργεια η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (Pho) να είναι ίση με 1, 2 και 3,5 g/L αντίστοιχα. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας, η μέγιστη παραγωγή πολυολών, η μέγιστη παραγωγή λίπους, η μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος παρατίθενται στους πίνακες 3.3 και 3.4 που ακολουθούν, με τις μέγιστες τιμές των στοιχείων των κινητικών που παρατηρήθηκαν και για τα δύο στελέχη σε ζύμωση με προσθήκη κατσίγαρου.

**Πίνακας 3.3:** Κινητικά δεδομένα του στελέχους *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 σε ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης ~70 g/L, με την προσθήκη κατσίγαρου έως ότου στο μέσο της καλλιέργειας οι φαινολικές ουσίες να έχουν συγκέντρωση 1 g/L, 2 g/L και 3,5 g/L, υπό συνθήκες περιοριστικές σε N.

<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5029														
Pho (g/L)	t (h)	X (g/L)	L (g/L)	Glccons (g/L)	Cit (g/L)	Man (g/L)	Ara (g/L)	Ery (g/L)	Y <sub>X/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>L/X</sub> % (w/w)	Y <sub>Cit/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>Man/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>Ara/Glc</sub> (g/g)	Y <sub>Ery/Glc</sub> (g/g)
~1,0	73β	9,3	1,7	25,40	2,6	3,4	0,8	3,7	<b>0,36</b>	17,8	0,10	0,13	0,03	0,15
	124ζ	10,5	1,3	50,63	12,0	6,6	2,0	8,9	0,21	11,9	0,24	0,13	0,04	0,18
	193α	<b>11,6</b>	0,6	66,2	25,1	8,84	2,03	7,8	0,18	5,5	0,38	0,13	0,03	0,11
	241γ,δ,ε	11,4	0,3	70,00	28,8	10,9	2,5	5,6	0,16	2,4	0,41	0,16	0,04	0,08
~2,0	192β	9,7	<b>2,0</b>	48,76	9,5	3,9	1,2	13,1	0,20	<b>20,0</b>	0,19	0,08	0,03	<b>0,27</b>
	242α,γ,δ,ε,ζ	<b>11,6</b>	1,6	70,00	31,5	5,3	2,0	<b>13,5</b>	0,17	13,8	0,45	0,08	0,03	0,19
~3,5	140β,δ,ζ	8,3	1,3	61,42	26,2	<b>13,1</b>	1,2	2,4	0,14	15,9	0,43	<b>0,21</b>	0,02	0,04
	240α,γ,ε	8,7	0,8	68,10	<b>37,4</b>	10,1	<b>3,1</b>	0,0	0,13	9,3	<b>0,55</b>	0,15	<b>0,05</b>	0,00



**Πίνακας 3.4:** Κινητικά δεδομένα του στελέχους *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 σε ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης ~70 g/L, με την προσθήκη κατσιγαρου έως ότου στο μέσο της καλλιέργειας οι φαινολικές ουσίες να έχουν συγκέντρωση 1 g/L, 2 g/L και 3,5 g/L, υπό συνθήκες περιοριστικές σε N.

*Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032

Pho (g/L)	t (h)	X (g/L)	L (g/L)	GloIcons (g/L)	Cit (g/L)	Man (g/L)	Ara (g/L)	Ery (g/L)	Y <sub>X/GloI</sub> (g/g)	Y <sub>L/X</sub> % (w/w)	Y <sub>Cit/GloI</sub> (g/g)	Y <sub>Man/GloI</sub> (g/g)	Y <sub>Ara/GloI</sub> (g/g)	Y <sub>Ery/GloI</sub> (g/g)
~1.0	73ε	8,0	1,1	34,30	10,3	3,8	3,1	5,6	<b>0,23</b>	13,6	0,30	0,11	0,11	0,16
	124β	9,4	1,3	60,80	19,9	10,4	2,0	10,9	0,16	14,2	0,33	0,17	0,17	0,18
	193γ	11,0	0,2	69,10	28,8	9,9	2,1	0,0	0,16	1,5	0,42	0,14	0,14	0,00
	217α	<b>11,3</b>	0,4	70,00	27,5	8,2	1,3	0,0	0,16	3,2	0,39	0,12	0,02	0,00
~2.0	124β	9,4	<b>2,0</b>	44,70	7,9	4,5	1,3	10,9	0,21	13,1	0,18	0,10	0,10	0,24
	192δ,ε,ζ	11,0	0,6	59,70	12,3	8,7	<b>6,8</b>	<b>15,0</b>	0,18	5,3	0,21	0,15	0,15	<b>0,25</b>
	216α	<b>11,3</b>	0,5	63,30	22,7	6,6	2,5	9,7	0,20	4,3	0,36	0,10	0,04	0,15
~3.5	97β	6,2	1,7	50,70	29,1	9,4	0,6	1,3	0,12	<b>27,7</b>	0,48	0,19	0,02	0,03
	116ε,ζ	6,3	1,2	59,60	29,1	13,0	1,1	2,2	0,11	19,1	0,49	<b>0,22</b>	<b>0,22</b>	0,04
	188α,γ,δ	8,3	1,3	68,60	<b>44,1</b>	<b>13,1</b>	0,3	0,0	0,12	15,2	<b>0,64</b>	0,19	0,19	0,00

Όπου t(h): χρόνος ζύμωσης, X(g/L): βιομάζα, L (g/L): λίπος, GloIcons (g/L): Καταναλωθείσα ποσότητα γλυκερόλης, Cit (g/L): κιτρικό οξύ, Man (g/L): μαννιτόλη, Ara (g/L): αραβιτόλη, Ery (g/L): ερυθριτόλη, Y<sub>X/GloI</sub> (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής βιομάζας προς καταναλωθείσα ποσότητα γλυκερόλης, Y<sub>L/X</sub> % (w/w): συντελεστής απόδοσης παραγωγής λίπους προς παραγόμενη ποσότητα βιομάζας επί της 100, Y<sub>Cit/GloI</sub> (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος προς ποσότητα καταναλωθείσας γλυκερόλης, Y<sub>Man/GloI</sub> (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής μαννιτόλης προς ποσότητα καταναλωθείσας γλυκερόλης, Y<sub>Ara/GloI</sub> (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής αραβιτόλης προς ποσότητα καταναλωθείσας γλυκερόλης, Y<sub>Ery/GloI</sub> (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής ερυθριτόλης προς ποσότητα καταναλωθείσας γλυκερόλης.

<sup>α</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

<sup>β</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

<sup>γ</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος (g/L).

<sup>δ</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης (g/L).

<sup>ε</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης (g/L).

<sup>στ</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή ερυθριτόλης (g/L).

\*Μετρήθηκαν οι ενδοπολυσακχαρίτες (δεν απεικονίζονται στον παραπάνω πίνακα) και η παραγωγή τους κυμαίνεται σε ποσοστό ~23-31% βάρος κατά βάρος ξηρής βιομάζας στις ζυμώσεις με συγκεντρώσεις φαινολικών Pho~ 1 g/L. Η προσθήκη YAE σε μεγαλύτερους όγκους μειώνει την παραγωγή τους (~20-25% βάρος κατά βάρος ξηρής βιομάζας).

- Τα δύο στελέχη που επιλέχθηκαν για τις ζυμώσεις τόσο στην blank καλλιέργεια όσο και στην καλλιέργεια με προσθήκη ΥΑΕ (blended media) έδειξαν ικανοποιητική ανάπτυξη. Σε όλες τις ζυμώσεις η πηγή υποστρώματος αφομοιώθηκε πλήρως. Η αφομοίωση της γλυκερόλης στην καλλιέργεια χωρίς προσθήκη κατσίγαρου έγινε για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 στις 240 ώρες ζύμωσης ενώ για το *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 έγινε ταχύτερα στις 191 ώρες ζύμωσης. Η προσθήκη ΥΑΕ στο μέσο της καλλιέργειας φάνηκε να επιταχύνει την αφομοίωση της γλυκερόλης και στα δύο στελέχη (αφομοίωση γλυκερόλης στις 192-216 ώρες ζύμωσης, 8-9 ημέρες).
- Η προσθήκη ΥΑΕ στο μέσο της καλλιέργειας δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή βιομάζας στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν. Και στα δύο στελέχη παρατηρείται σημαντική παραγωγή βιομάζας, με τις μέγιστες τιμές να είναι περίπου ίδιες με αυτές που σημειώνονται στις ζυμώσεις χωρίς προσθήκη κατσίγαρου. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρείται στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 στις 242 ώρες (11,6 g/L) με συντελεστή απόδοσης βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα στο ίδιο σημείο ίσο με 0,17. Το ίδιο στέλεχος παρουσιάζει και τις μεγαλύτερες τιμές συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα ( $Y_{X/Glcl}$ ) σε όλες τις ζυμώσεις που διενεργήθηκαν, έναντι του *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032. Στις ζυμώσεις και των δύο στελεχών, παρατηρείται αύξηση της παραγόμενης βιομάζας με αυξανόμενη προσθήκη κατσίγαρου έως και συγκεντρώσεις φαινολικών 2 g/L. Στις ζυμώσεις με ψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών στο μέσο της καλλιέργειας (3,5 g/L) η παραγωγή βιομάζας μειώνεται. Οι συντελεστές απόδοσης παραγωγής βιομάζας  $Y_{X/Glcl}$  μειώνονται επίσης, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των φαινολικών και στα δύο στελέχη.
- Η προσθήκη ΥΑΕ στο μέσο της καλλιέργειας επηρεάζει την παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών. Σε όλες τις ζυμώσεις με προσθήκη ΥΑΕ που διενεργήθηκαν, σημειώθηκαν χαμηλότερες τιμές ενδοπολυσακχαριτών από αυτές στις blank ζυμώσεις. Μεταξύ των δύο στελεχών και των ζυμώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινολικών, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές. Στις ζυμώσεις με προσθήκη κατσίγαρου η παραγωγή

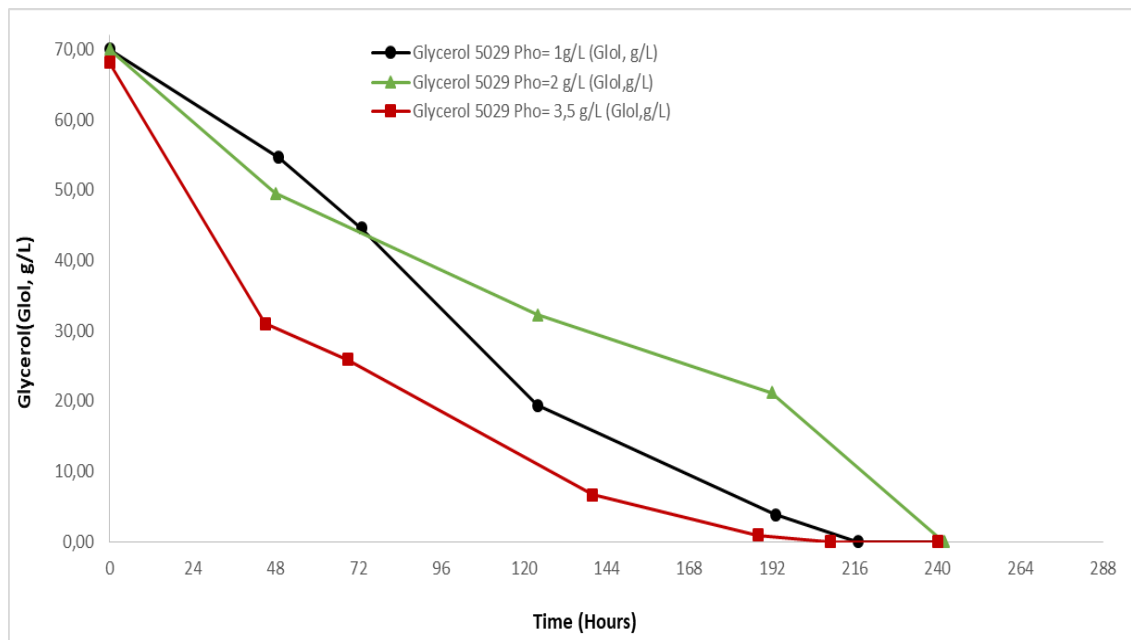
ενδοπολυσακχαριτών φτάνει σταδιακά, στις 100 ώρες μετά τον εμβολιασμό περίπου, σε ποσοστό ~20% βάρος κατά βάρος ξηρής βιομάζας και παραμένει σε ~20-24% για την διάρκεια της υπόλοιπης ζύμωσης.

- Και στα πειράματα της μελέτης αυτής διαπιστώνεται ότι τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, δεν παρουσιάζουν σημαντική ελαιογόνο ικανότητα όταν καλλιέργούνται σε υπόστρωμα γλυκερόλης με περιοριστικό στοιχείο αύξησης το άζωτο (Papanikolaou et al., 2009; Papanikolaou and Aggelis, 2010; Athenaki et al., 2018; Carsanba et al., 2018). Παρότι γενικά η προσθήκη ΥΑΕ στο υποστρώμα της ζύμωσης, θα έπρεπε θεωρητικά να αναστέλλει την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, λόγω των φαινολικών ενώσεων που περιέχει, στην παρούσα μελέτη κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε. Η μέγιστη τιμή λίπους έφτασε σε 2 g/L και για τα δύο στελέχη σε Pho ~2,0 g/L, στις 192 ώρες ζύμωσης και συντελεστή απόδοσης  $Y_{L/X}$  20% για το στέλεχος 5029 και στις 124 ώρες ζύμωσης και συντελεστή απόδοσης  $Y_{L/X}$  13,1% για το 5032. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να συμπληρώσουν τα ευρήματα άλλων μελετών, στις οποίες καταδεικνύεται η θετική επίδραση της προσθήκης ΥΑΕ στην συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους σε ζυμώσεις διαφόρων μικροοργανισμών (Papanikolaou et al., 2008; Sarris et al., 2011;).
- Ως προς την παραγωγή πολυολών και τα δύο στελέχη εμφανίζουν αξιοσημείωτη ικανότητα παραγωγής πολυολών αλλά οι μέγιστες τιμές τους παρατηρούνται στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032. Η παραγωγή της μαννιτόλης δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν με προσθήκη κατσίγαρου, εκτός από τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε συγκέντρωση φαινολικών 2 g/L, όπου και σημειώνεται πτώση στη μέγιστη τιμή της  $Man_{max}$  σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα (5,3 g/L για το 5029 και 8,7 g/L για το 5032). Την ίδια τάση φαίνεται να παρουσιάζει και η παραγωγή της αραβιτόλης η οποία παράγεται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις και παρουσιάζει μέγιστη τιμή  $Ara_{max}$  = 2 g/L για το 5029 και  $Ara_{max}$  = 6,8 g/L για το 5032. Αντιθέτως, η παραγωγή της ερυθριτόλης παρουσιάζει πτωτική τάση στις ζυμώσεις με προσθήκη κατσίγαρου. Στις ζυμώσεις με συγκέντρωση φαινολικών ~3,5 g/L παράγεται πολύ λιγότερη ερυθριτόλη (2,4 g/L και 2,2 g/L για το 5029 και 5032 αντίστοιχα) πιθανότατα

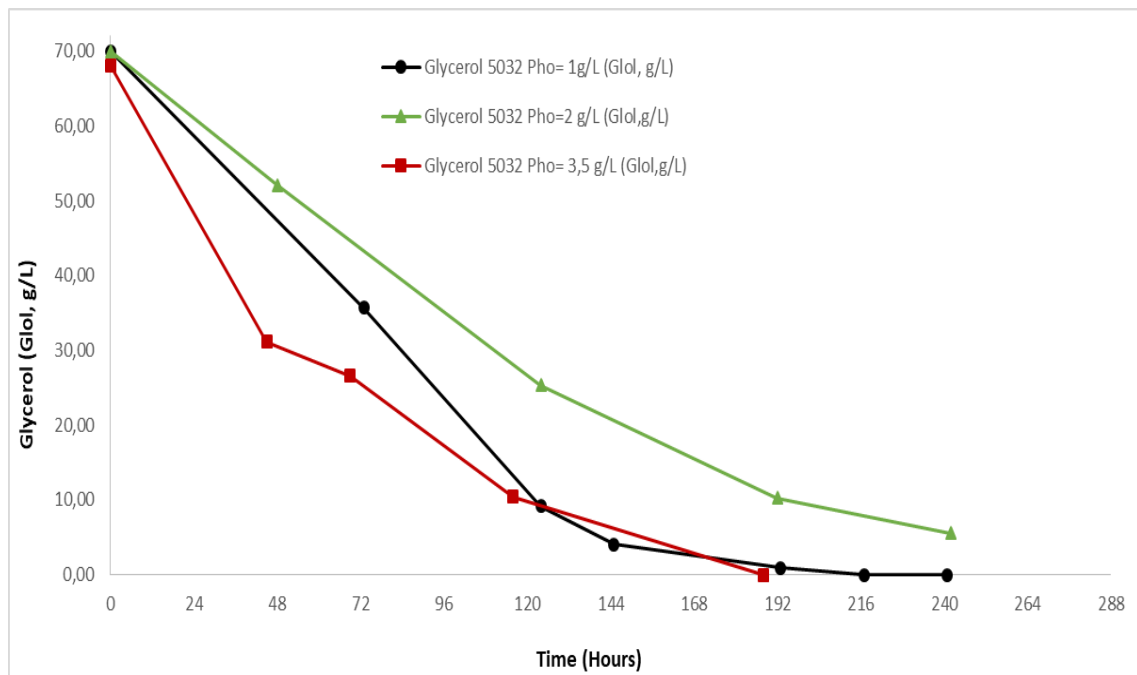
λόγω στροφής του μεταβολισμού του κυττάρου στην παραγωγή κιτρικού οξέος. Και σε αυτήν την περίπτωση εξαίρεση αποτελούν οι ζυμώσεις με συγκέντρωση φαινολικών 2 g/L όπου η ερυθριτόλη παρουσιάζει τις μεγαλύτερες μέγιστες τιμές από όλες τις ζυμώσεις. Συγκεκριμένα για το 5029,  $E_{ry_{max}}=13,5$  g/L και  $Y_{Ery/Glcl}=0.19$  g/g και για το 5032  $E_{ry_{max}}=15$  g/L και  $Y_{Ery/Glcl}=0.25$  g/g.

- Η παραγωγή κιτρικού οξέος επηρεάζεται αρκετά από την προσθήκη ΥΑΕ στο υποστρώμα της καλλιέργειας. Και για τα δύο στελέχη στις ζυμώσεις με συγκέντρωση φαινολικών έως και ~2 g/L, παρατηρούνται μικρότερες τιμές μέγιστου κιτρικού οξέος. Στις ζυμώσεις με συγκέντρωση φαινολικών ~1 g/L η μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος παρουσιάζεται για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 στις 241 ώρες, στο τέλος της ζύμωσης με συγκέντρωση 28,8 g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος προς καταναλωθέν υπόστρωμα 0,41. Στις ζυμώσεις με συγκέντρωση φαινολικών ~2 g/L η  $C_{it_{max}}$  παρουσιάζεται για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 στις 242 ώρες, στο τέλος της ζύμωσης με συγκέντρωση 31,5 g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος προς καταναλωθέν υπόστρωμα 0,45. Στις ζυμώσεις με συγκέντρωση φαινολικών Pho ~3,5 g/L του στελέχους ACA-YC 5032, επιτεύχθηκε η μεγαλύτερη παραγωγή κιτρικού οξέος από όλα τα πειράματα που διενεργήθηκαν σε φιάλες ( $C_{it_{max}}=44,4$  g/L,  $Y_{Cit/Glcl}=0,64$ g/g).
- Στα πειράματα που διενεργήθηκαν διαπιστώνεται η ικανότητα των δύο στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 και ACA-YC 5032 να παράγουν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εξωκυτταρικά προϊόντα (πολυόλες και κιτρικό οξύ) και σε μικρότερες να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά προϊόντα (ενδο-πολυσακχαρίτες, λιπίδια και βιομάζα), όταν αναπτύσσονται σε υποστρώμα γλυκερόλης με περιοριστικό στοιχείο αύξησης το άζωτο.

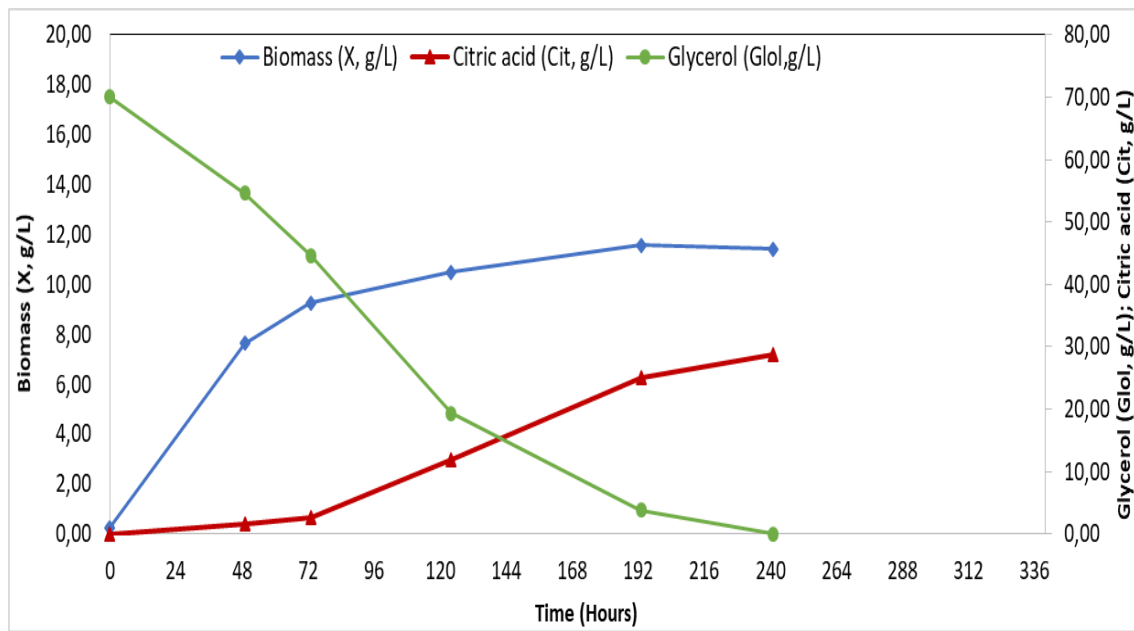
Ακολουθούν τα διαγράμματα της κατανάλωσης της γλυκερόλης, της μεταβολής της βιομάζας, της μεταβολής του μικροβιακού λίπους, του κιτρικού οξέος και των πολυολών σε συνάρτηση με τον χρόνο, για τις ζυμώσεις βυθού που πραγματοποιήθηκαν.



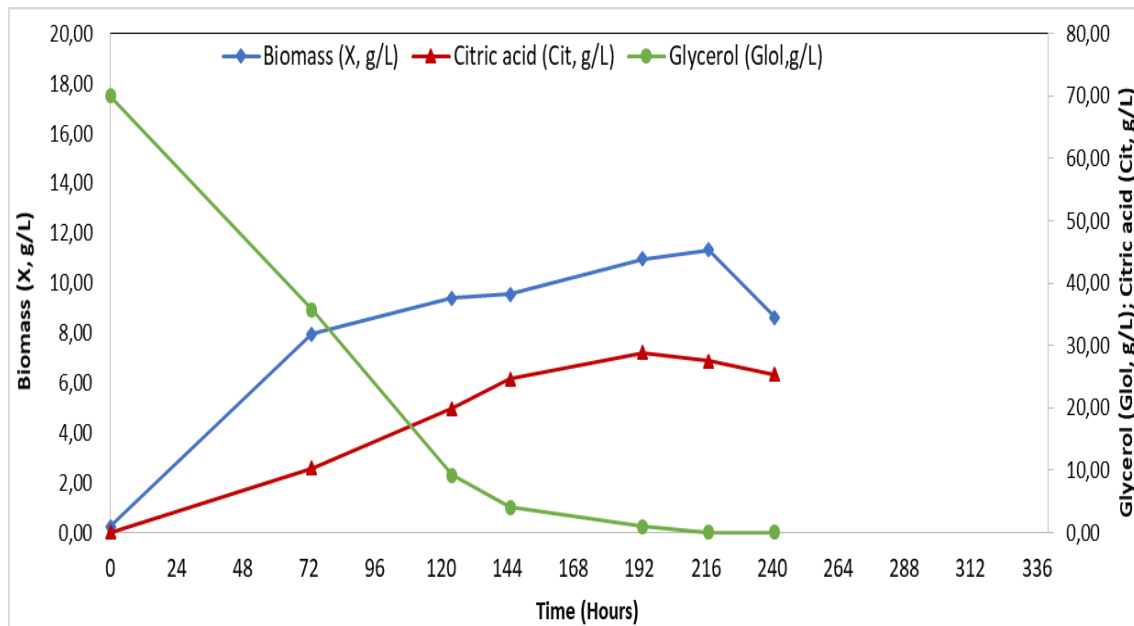
**Γράφημα 3.2α):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (για ζυμώσεις με συγκεντρώσεις φαινολικών Phos = ~1g/L, Phos = ~2g/L, Phos = ~3,5 g/L ).



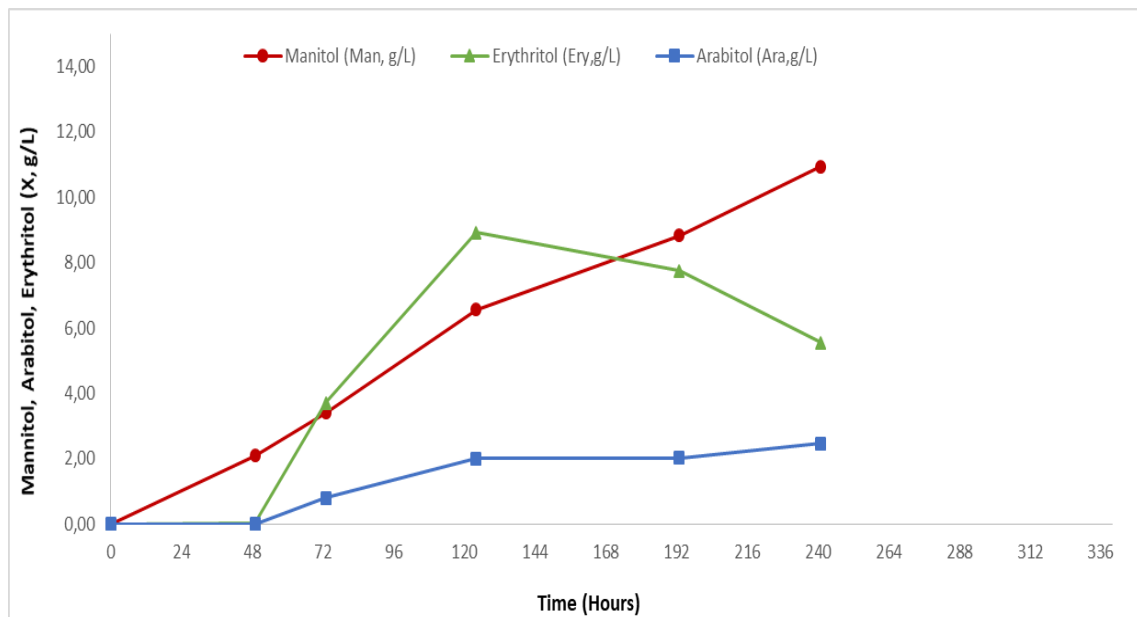
**Γράφημα 3.2β):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (για ζυμώσεις με συγκεντρώσεις φαινολικών Phos = ~1g/L, Phos = ~2g/L, Phos = ~3,5 g/L ).



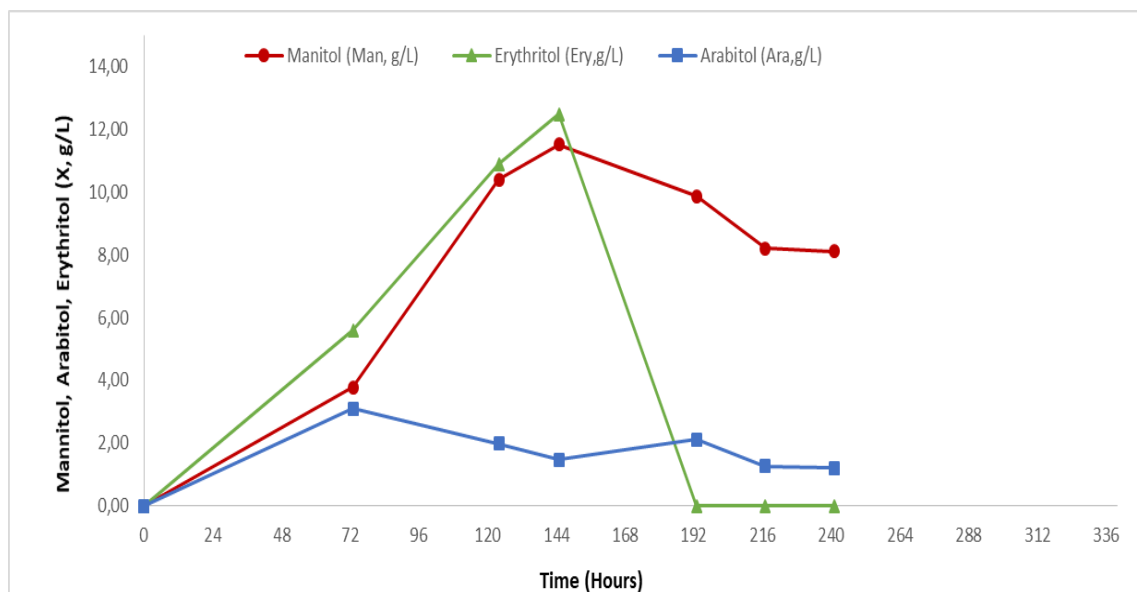
**Γράφημα 3.2.1α):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης, την μεταβολή της βιομάζας και του κιτρικού οξέος ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho $\approx$ 1g/L ).



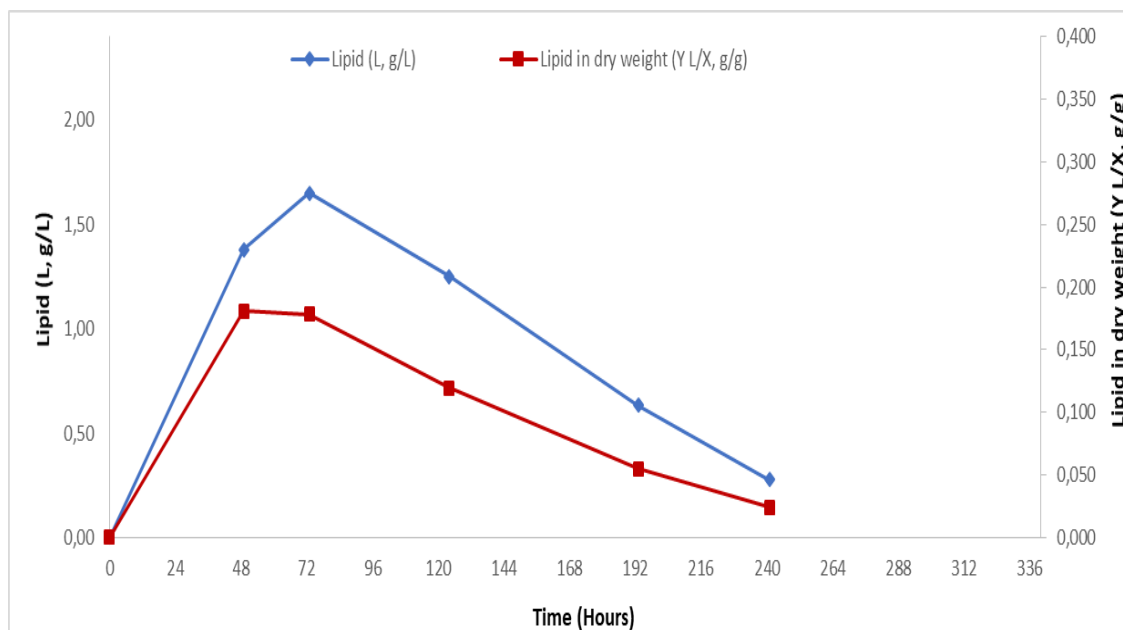
**Γράφημα 3.2.1β):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης, την μεταβολή της βιομάζας και του κιτρικού οξέος ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho $\approx$ 1g/L ).



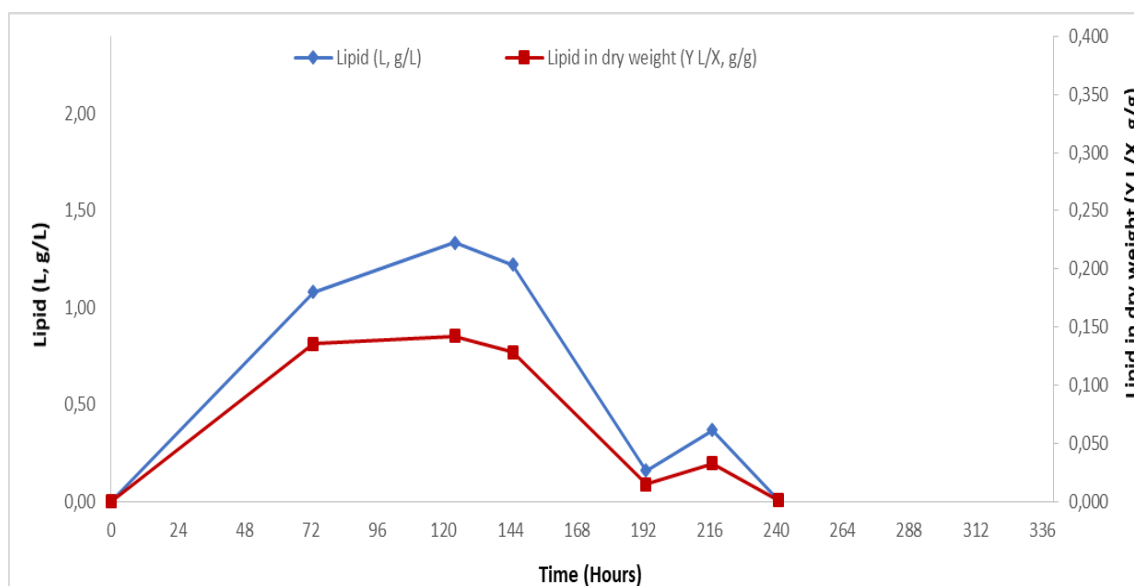
**Γράφημα 3.2.1γ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή της παραγόμενης μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho $\approx$ 1g/L).



**Γράφημα 3.2.1δ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή της παραγόμενης μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho $\approx$ 1g/L).

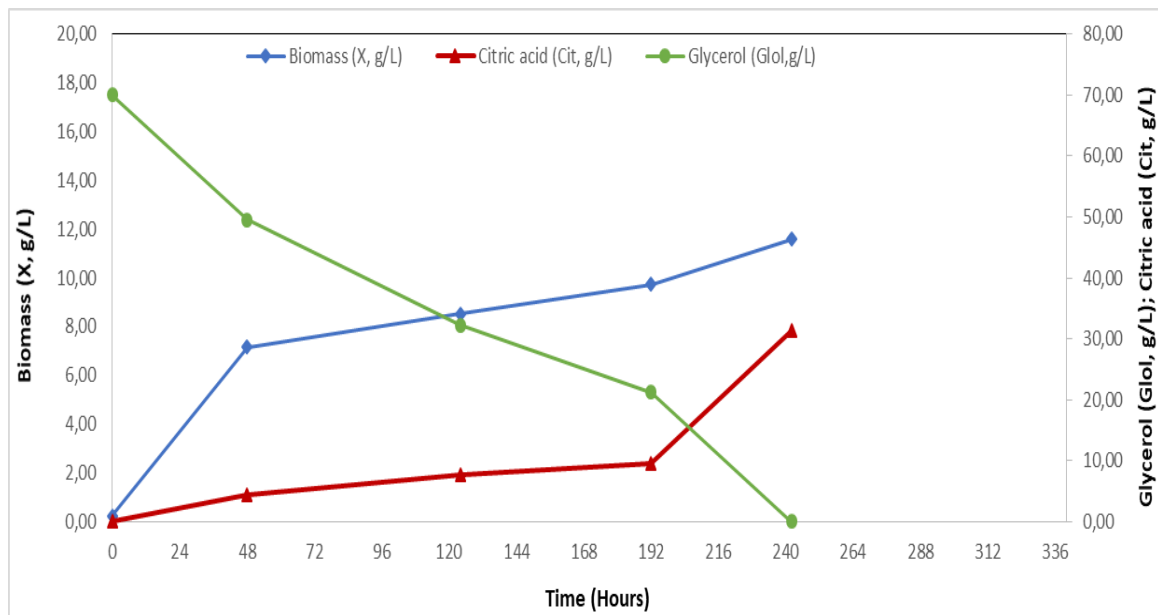


**Γράφημα 3.2.1ε):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή του παραγόμενου μικροβιακού λίπους και του συντελεστή απόδοσης λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα, ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho $\approx$ 1g/L).

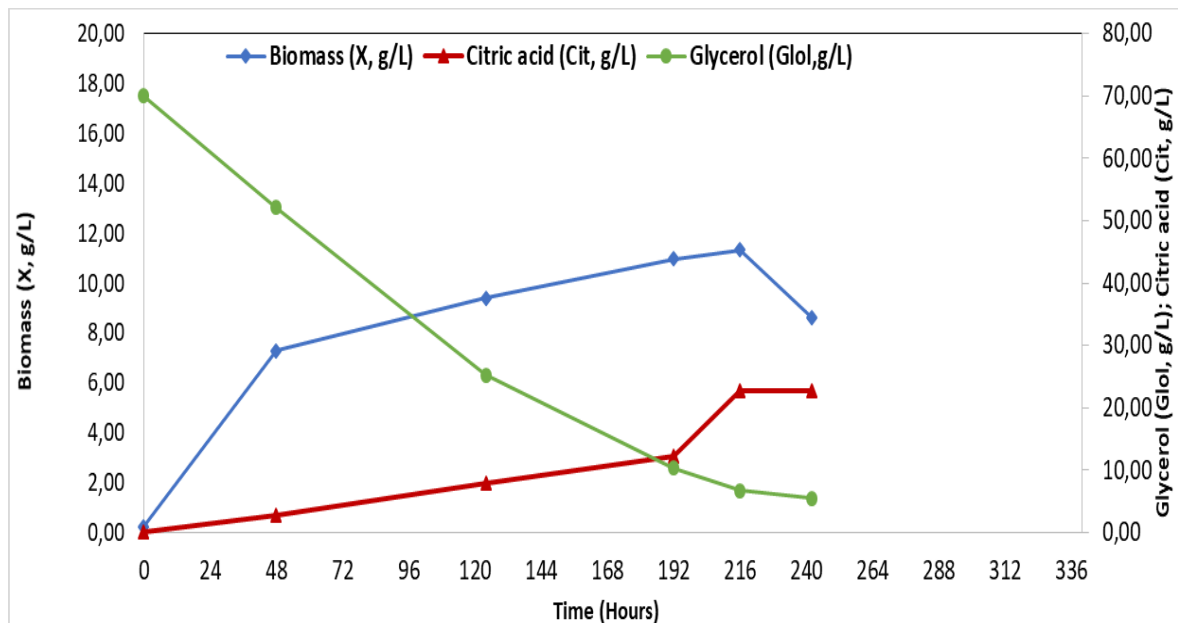


**Γράφημα 3.2.1στ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή του παραγόμενου μικροβιακού λίπους και του συντελεστή απόδοσης λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα, ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho $\approx$ 1g/L).

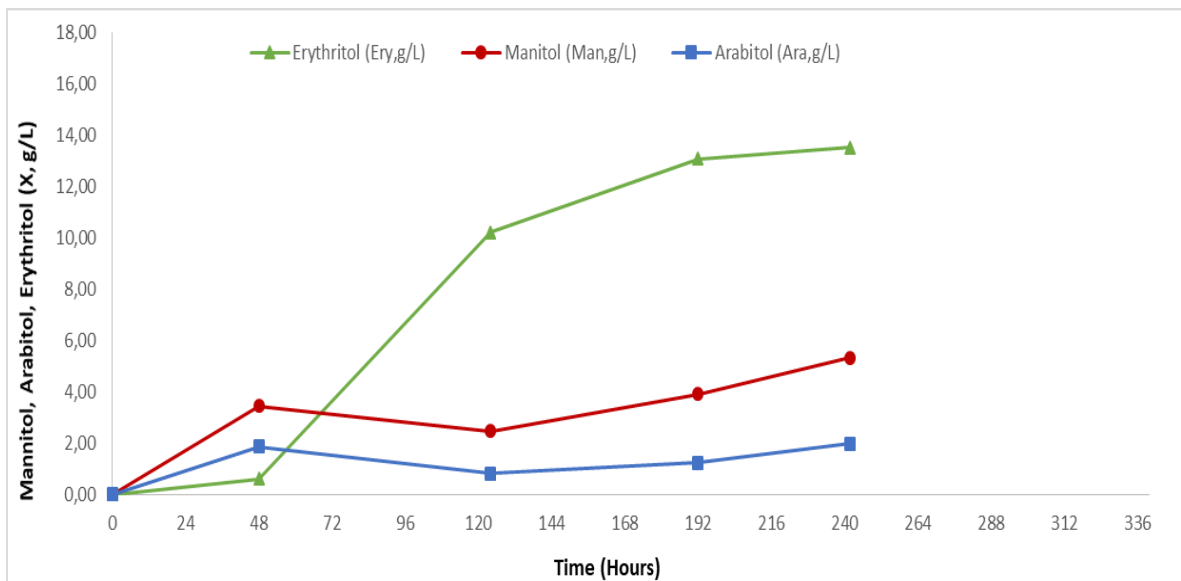




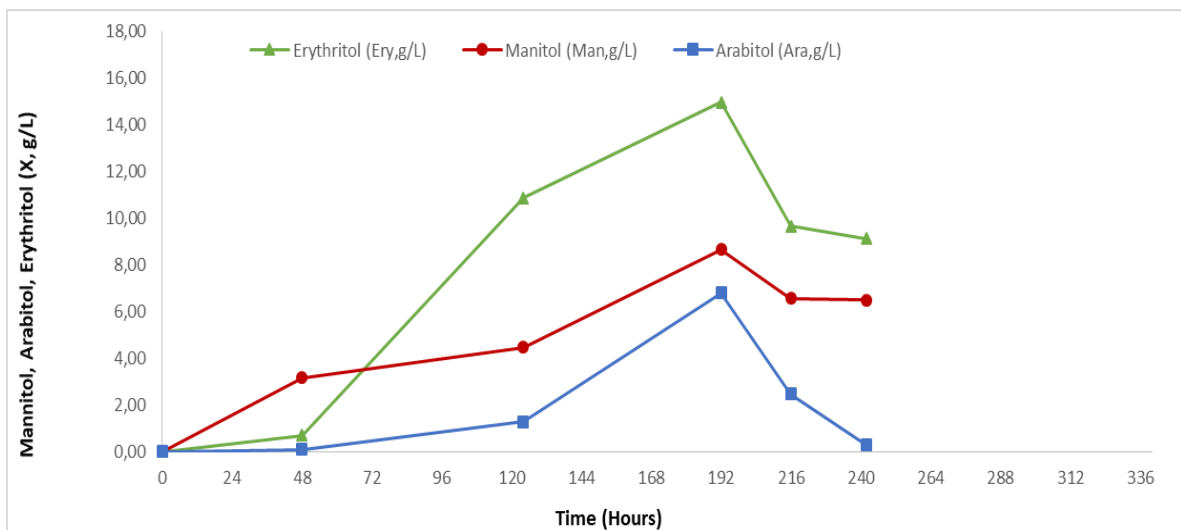
**Γράφημα 3.2.2α):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης, την μεταβολή της βιομάζας και του κιτρικού οξέος ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Ph<sub>0</sub>~2g/L).



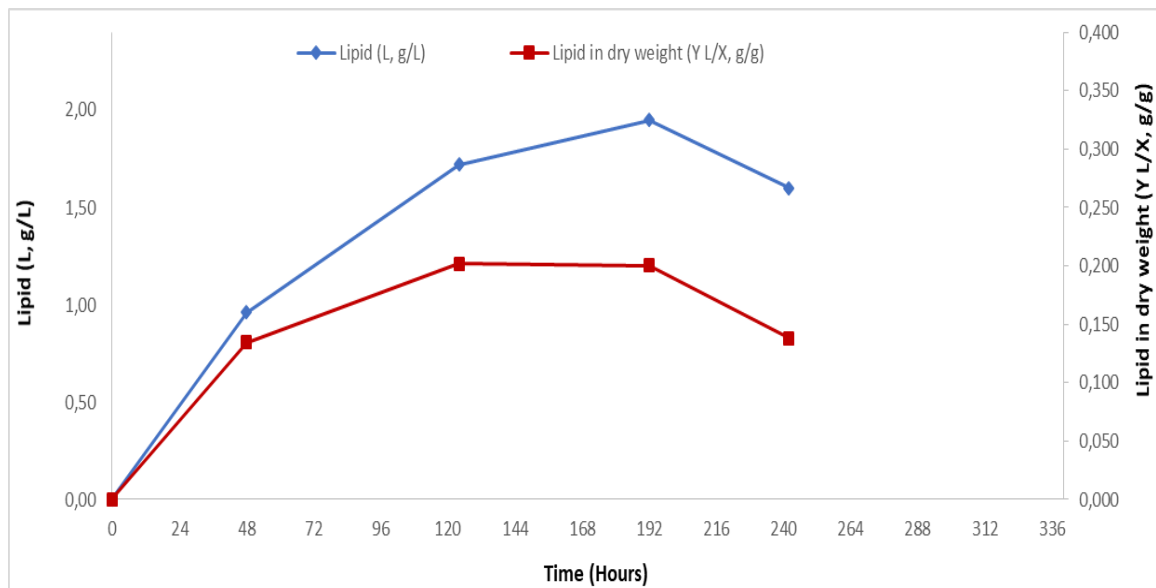
**Γράφημα 3.2.2β):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης, την μεταβολή της βιομάζας και του κιτρικού οξέος ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Ph<sub>0</sub>~2g/L).



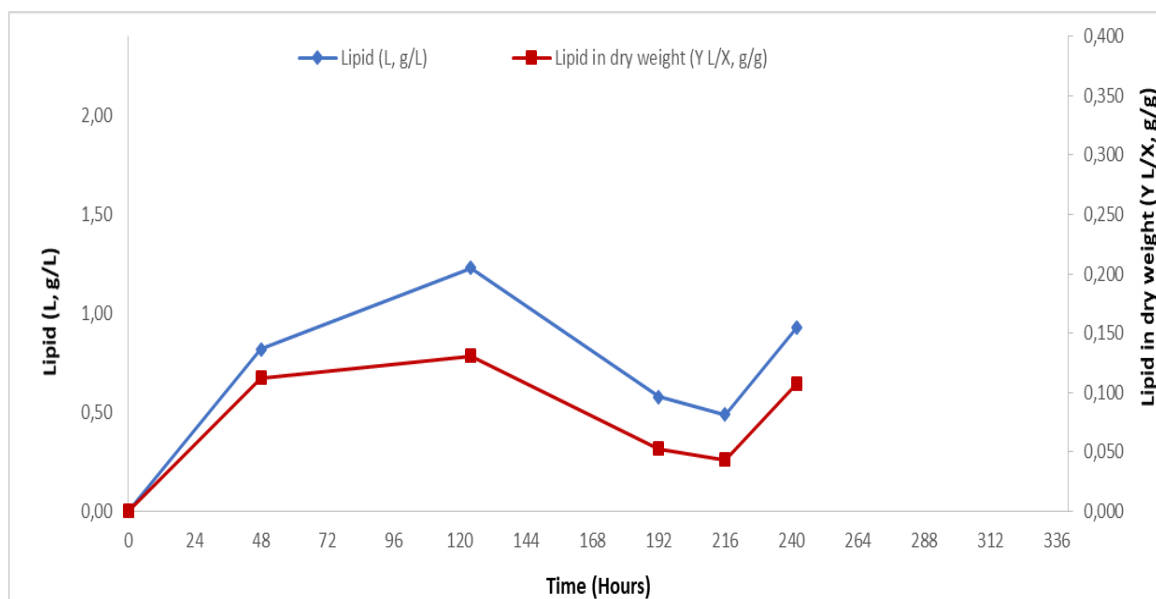
**Γράφημα 3.2.2γ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή της παραγόμενης μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών P<sub>ho</sub>≈2g/L).



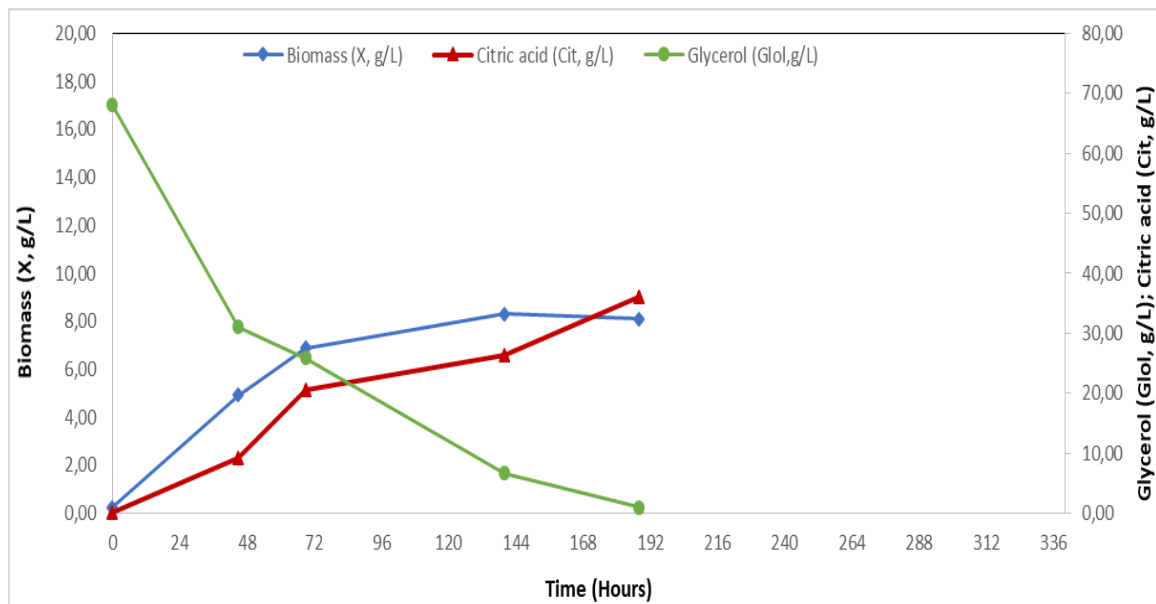
**Γράφημα 3.2.2δ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή της παραγόμενης μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών P<sub>ho</sub>≈2g/L).



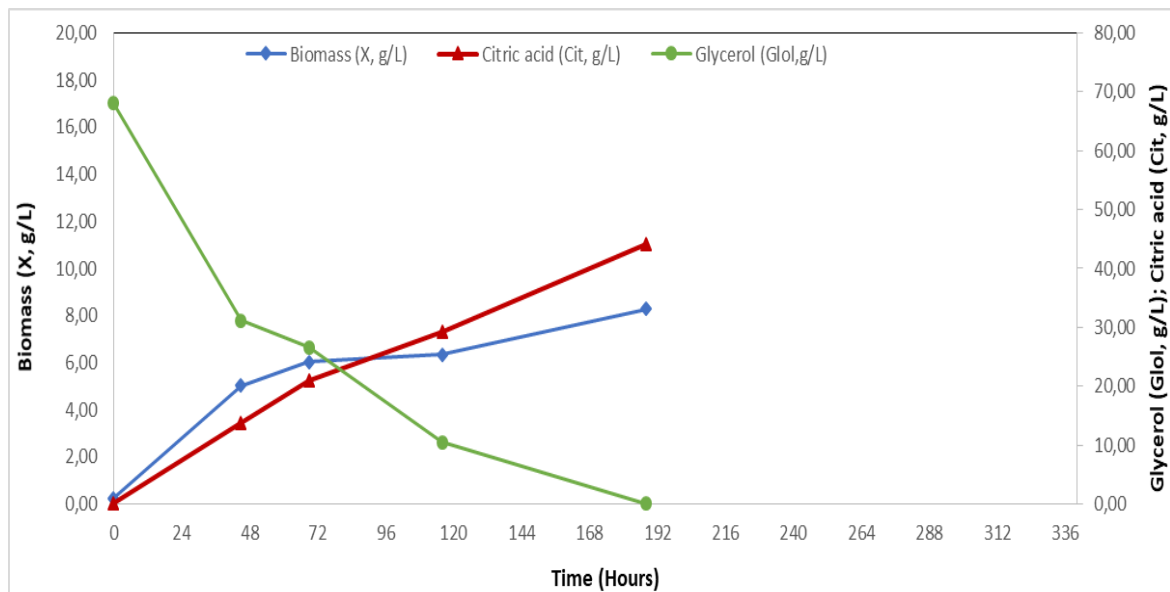
**Γράφημα 3.2.2ε):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή του παραγόμενου μικροβιακού λίπους και του συντελεστή απόδοσης λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα, ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho $\approx$ 2g/L).



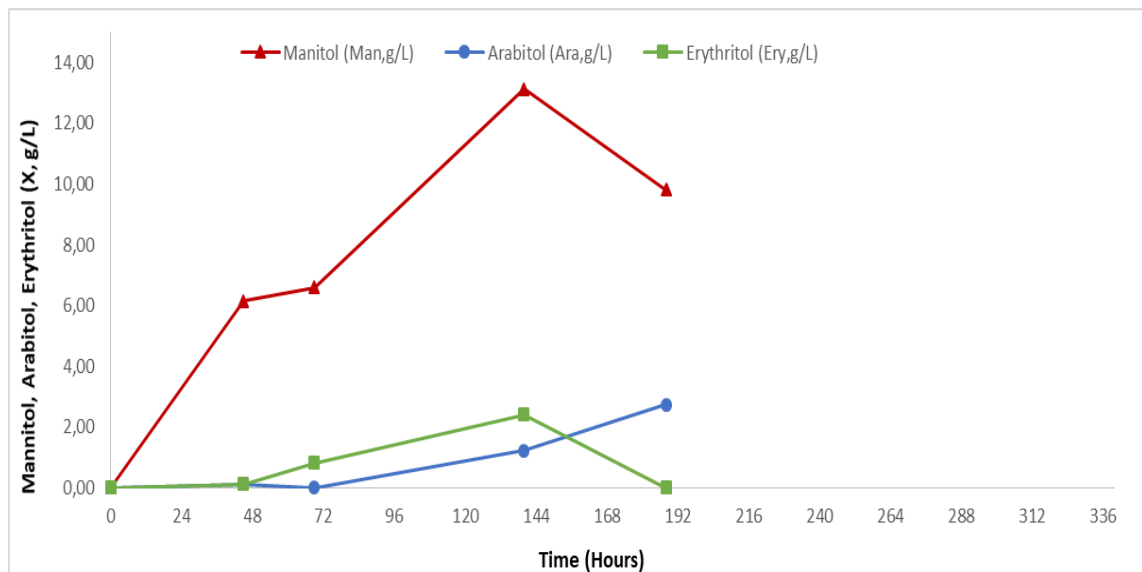
**Γράφημα 3.2.2στ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή του παραγόμενου μικροβιακού λίπους και του συντελεστή απόδοσης λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα, ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho $\approx$ 2g/L).



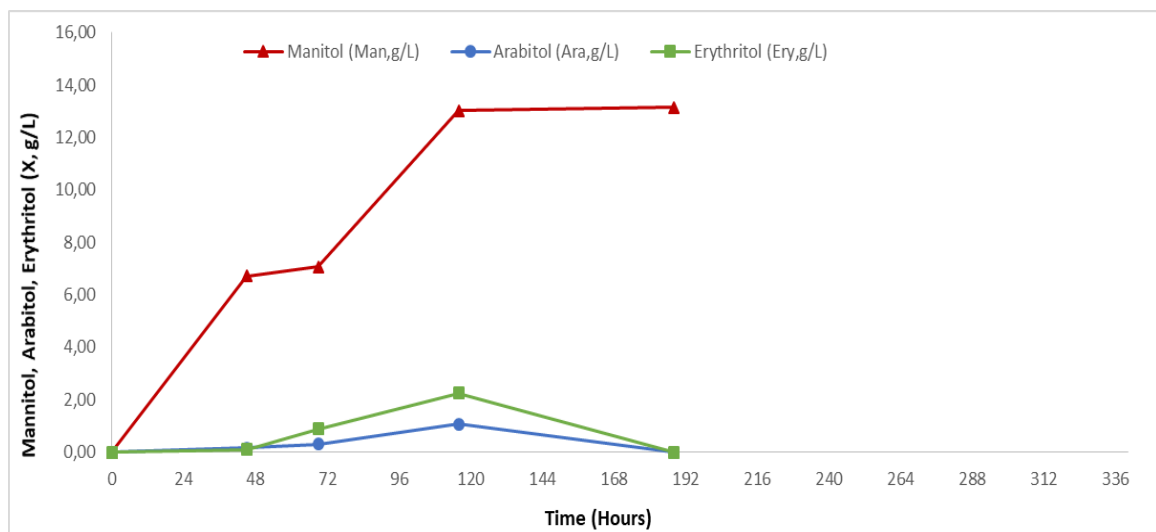
**Γράφημα 3.2.3α):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης, την μεταβολή της βιομάζας και του κιτρικού οξέος ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Ph<sub>0</sub>~3,5 g/L ).



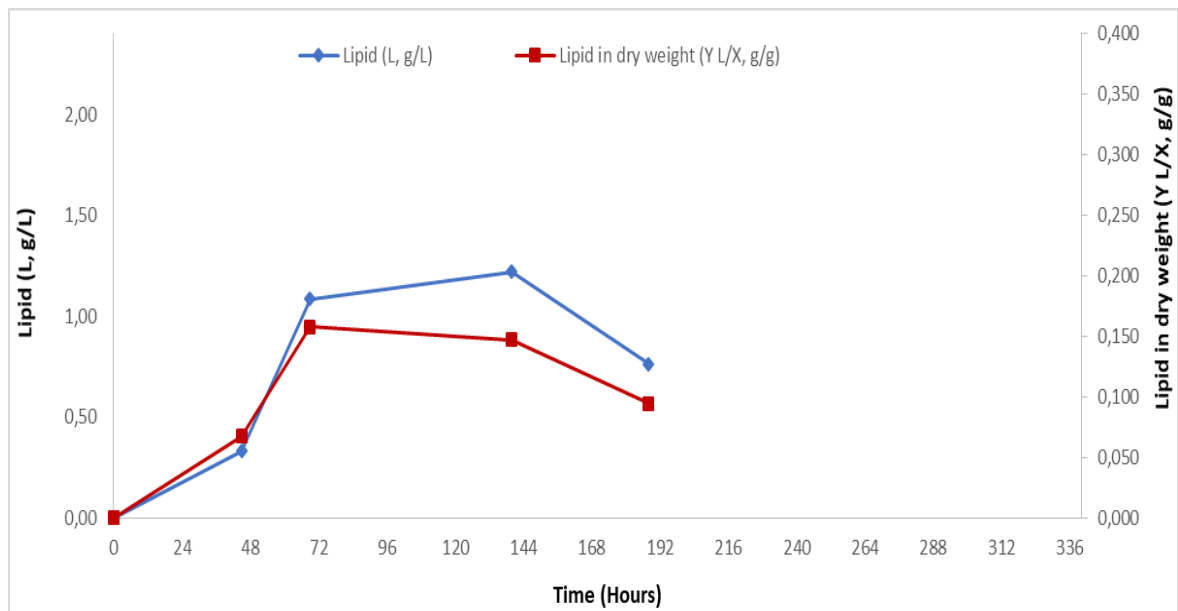
**Γράφημα 3.2.3β):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης, την μεταβολή της βιομάζας και του κιτρικού οξέος ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Ph<sub>0</sub>~3,5 g/L ).



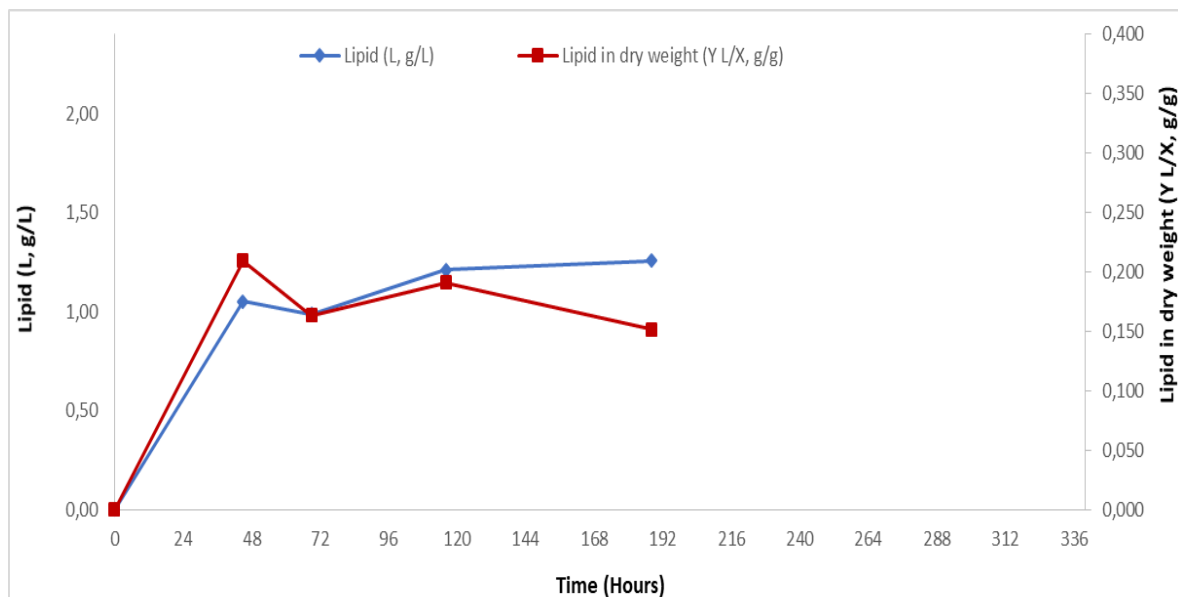
**Γράφημα 3.2.3γ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή της παραγόμενης μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho $\approx$ 3,5g/L).



**Γράφημα 3.2.3δ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή της παραγόμενης μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Pho $\approx$ 3,5g/L).



**Γράφημα 3.2.3ε):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 με την μεταβολή του παραγόμενου μικροβιακού λίπους και του συντελεστή απόδοσης λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα, ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Ph<sub>0</sub>≈3,5g/L).



**Γράφημα 3.2.3στ):** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή του παραγόμενου μικροβιακού λίπους και του συντελεστή απόδοσης λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα, ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών Ph<sub>0</sub>≈3,5g/L).

### **3.3 Καλλιέργειες κλειστού τύπου (batch) και ημισυνεχούς τροφοδοτούμενου τύπου (fed-batch) σε βιοαντιδραστήρα του στελέχους *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 ( $S_0=70$ g/L γλυκερόλης) χωρίς προσθήκη ΥΑΕ και με προσθήκη ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις φαινολικών $Pho=3,5$ g/L.**

Εκτός από τις ζυμώσεις βυθού σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer, πραγματοποιήθηκαν σε τρίτο στάδιο και ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα (New Brunswick Scientific, USA) όγκου 4L και ενεργού όγκου 2 L. Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC- 5032, γιατί συγκριτικά με το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC- 5029 παρήγαγε περισσότερες πολυόλες και κιτρικό οξύ σε όλες τις συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών.

Τα πειράματα στον βιοαντιδραστήρα έγιναν σε αρχικές συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών  $Pho= 0,0$  g/L και  $Pho= 3,5$  g/L. Η ζύμωση χωρίς προσθήκη κατσίγαρου ξεκίνησε ως batch και συνέχισε ως fed-batch αφού καταναλώθηκε αρκετά γρήγορα το υπόστρωμα γλυκερόλης. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν  $\sim 70$  g/L και, μόλις έφθασε περίπου τα 10 g/L στις 100 ώρες ζύμωσης, ξεκίνησε η εξωτερική τροφοδοσία γλυκερόλης (πρώτο feed), η οποία έγινε με πυκνό διάλυμα γλυκερόλης. Η συγκέντρωση της γλυκερόλης βρέθηκε να είναι  $\sim 50$  g/L μετά την τροφοδοσία. Όταν η συγκέντρωση της γλυκερόλης έπεσε ξανά στα  $\sim 5$  g/L επαναλήφθηκε μία δεύτερη τροφοδοσία γλυκερόλης (δεύτερο feed) στις 165,5 ώρες ζύμωσης και έφτασε σε συγκέντρωση  $\sim 35$  g/L μετά και την δεύτερη αυτή τροφοδοσία.

Στον βιοαντιδραστήρα πέρα από την ζύμωση αναφοράς (blank) πραγματοποιήθηκε και μία δεύτερη ζύμωση (batch) με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης  $\sim 70$  g/L και συγκέντρωση γλυκερόλης  $Pho= 3,5$  g/L.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα από τις fed-batch ζυμώσεις, που πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας, η μέγιστη παραγωγή πολυολών, η μέγιστη παραγωγή λίπους, η μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος παρατίθενται στον πίνακα 3.5 που ακολουθεί, με τις μέγιστες τιμές των στοιχείων των κινητικών που παρατηρήθηκαν για το στέλεχος *Yarrowia*

*lipolytica* ACA-YC 5032 σε ζύμωση αναφοράς (blank) και ζύμωση με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών Pho= 3,5 g/L.

**Πίνακας 3.5.1:** Κινητικά δεδομένα του στελέχους *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 σε ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης ~70 g/L, για τη ζύμωση χωρίς προσθήκη κατσίγαρου και για τη ζύμωση με συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών Pho= 3,5 g/L, υπό συνθήκες περιοριστικές σε N (ζυμώσεις batch σε βιοαντιδραστήρα).

### *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 bioreactor

Pho (g/L)	t (h)	X (g/L)	L (g/L)	GloIcons (g/L)	Cit (g/L)	Man (g/L)	Ara (g/L)	Ery (g/L)	Y <sub>X/GloI</sub> (g/g)	Y <sub>L/X%</sub> (w/w)	Y <sub>Cit/Glo</sub> (g/g)	Y <sub>Man/GloI</sub> (g/g)	Y <sub>Ara/GloI</sub> (g/g)	Y <sub>Ery/GloI</sub> (g/g)
~0,0	78 $\alpha$ , $\beta$	<b>7,9</b>	<b>2,2</b>	58,3	29,9	3,5	0,0	4,5	<b>0,14</b>	28,0	0,51	0,06	0,00	<b>0,08</b>
	97 $\gamma$ , $\delta$ , $\sigma$ t	7,1	1,5	64,6	<b>47,7</b>	4,6	0,0	<b>4,6</b>	0,11	21,7	<b>0,78</b>	0,08	0,00	<b>0,08</b>
~3,5	140 $\alpha$ , $\gamma$	5,1	0,5	58,5	38,2	6,1	0,0	0,0	0,09	10,3	0,65	0,10	0,00	0,00
	44 $\beta$	2,8	0,9	28,9	12,0	4,8	0,0	0,0	<b>0,10</b>	<b>31,1</b>	0,42	<b>0,17</b>	0,00	0,00
	115 $\delta$	4,9	0,5	57,8	33,9	<b>6,5</b>	0,0	0,0	0,10	10,0	0,66	0,11	0,00	0,00

**Πίνακας 3.5.2:** Κινητικά δεδομένα του στελέχους *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 σε ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης ~70 g/L, για τη ζύμωση χωρίς προσθήκη YAE (fed-batch)

### *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 bioreactor

Pho (g/L)	t (h)	X (g/L)	L (g/L)	GloIcons (g/L)	Cit (g/L)	Man (g/L)	Ara (g/L)	Ery (g/L)	Y <sub>X/GloI</sub> (g/g)	Y <sub>L/X%</sub> (w/w)	Y <sub>Cit/GloI</sub> (g/g)	Y <sub>Man/GloI</sub> (g/g)	Y <sub>Ara/GloI</sub> (g/g)	Y <sub>Ery/GloI</sub> (g/g)
~0,0	97 $\delta$ , $\sigma$ t	7,1	1,5	64,6	47,7	<b>4,6</b>	0,0	<b>4,6</b>	<b>0,11</b>	21,7	0,78	0,08	0,00	<b>0,08</b>
	125, $\alpha$	<b>8,0</b>	1,4	90,90	69,3	2,9	0,0	0,0	<b>0,09</b>	17,6	0,76	0,03	0,00	0,00
	164 $\beta$	8,0	<b>3,1</b>	105,50	80,3	2,8	0,0	0,0	0,08	38,5	0,76	0,03	0,00	0,00
	199 $\gamma$	7,0	2,0	123,30	<b>105,7</b>	2,1	0,0	0,0	0,06	27,7	<b>0,86</b>	0,02	0,00	0,00



Όπου t(h): χρόνος ζύμωσης, X(g/L): βιομάζα, L (g/L): λίπος, Glolcons (g/L): Καταναλωθείσα ποσότητα γλυκερόλης, Cit (g/L): κιτρικό οξύ, Man (g/L): μαννιτόλη, Ara (g/L): αραβιτόλη, Ery (g/L): ερυθριτόλη,  $Y_{X/Glol}$  (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής βιομάζας προς καταναλωθείσα ποσότητα γλυκερόλης,  $Y_{L/X}$  % (w/w): συντελεστής απόδοσης παραγωγής λίπους προς παραγόμενη ποσότητα βιομάζας επί της 100,  $Y_{Cit/Glol}$  (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος προς ποσότητα καταναλωθείσας γλυκερόλης,  $Y_{Man/Glol}$  (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής μαννιτόλης προς ποσότητα καταναλωθείσας γλυκερόλης,  $Y_{Ara/Glol}$  (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής αραβιτόλης προς ποσότητα καταναλωθείσας γλυκερόλης,  $Y_{Ery/Glol}$  (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγωγής ερυθριτόλης προς ποσότητα καταναλωθείσας γλυκερόλης.

<sup>α</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

<sup>β</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

<sup>γ</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος (g/L).

<sup>δ</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης (g/L).

<sup>ε</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης (g/L).

<sup>στ</sup> Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή ερυθριτόλης (g/L).

\*Μετρήθηκαν οι ενδοπολυσακχαρίτες (δεν απεικονίζονται στον παραπάνω πίνακα) και η παραγωγή τους κυμαίνεται σε ποσοστό ~1,5-2 % βάρους κατά βάρους ξηρής βιομάζας στις ζυμώσεις που διενεργήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα.

- Το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 τόσο στην blank καλλιέργεια όσο και στην καλλιέργεια με προσθήκη YAE (blended media) έδειξε ικανοποιητική ανάπτυξη στον βιοαντιδραστήρα. Παρόλα αυτά και στις δύο ζυμώσεις η πηγή υποστρώματος δεν αφομοιώθηκε πλήρως. Στην καλλιέργεια χωρίς προσθήκη κατσίγαρου η ζύμωση ως batch τερματίστηκε στις 97 ώρες και συνεχίστηκε ως fed-batch. Το πείραμα τερματίστηκε στις 199 ώρες ζύμωσης (~8 ημέρες) με την συγκέντρωση της γλυκερόλης να έχει να σταματήσει να καταναλώνεται και η συγκέντρωση της να είναι ~20 g/L. Στην καλλιέργεια με προσθήκη κατσίγαρου το πείραμα τερματίστηκε στις 140 ώρες ζύμωσης (~6 ημέρες). Δεν έγινε εξωτερική τροφοδοσία γλυκερόλης (feed) στην περίπτωση αυτή και η γλυκερόλη σταμάτησε επίσης να καταναλώνεται όταν η συγκέντρωση της έφτασε ~20 g/L. Σε αντίθεση με τις ζυμώσεις βυθού, στις ζυμώσεις που διενεργήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα, η προσθήκη YAE στο μέσο της καλλιέργειας φάνηκε να επιβραδύνει την αφομοίωση της γλυκερόλης (αφομοίωση σχεδόν όλης της γλυκερόλης στις 140 ώρες ζύμωσης για την ζύμωση με προσθήκη YAE στον βιοαντιδραστήρα, έναντι 97 ωρών στην ζύμωση χωρίς προσθήκη YAE στον βιοαντιδραστήρα. Δεν εμφανίζει μεγάλες

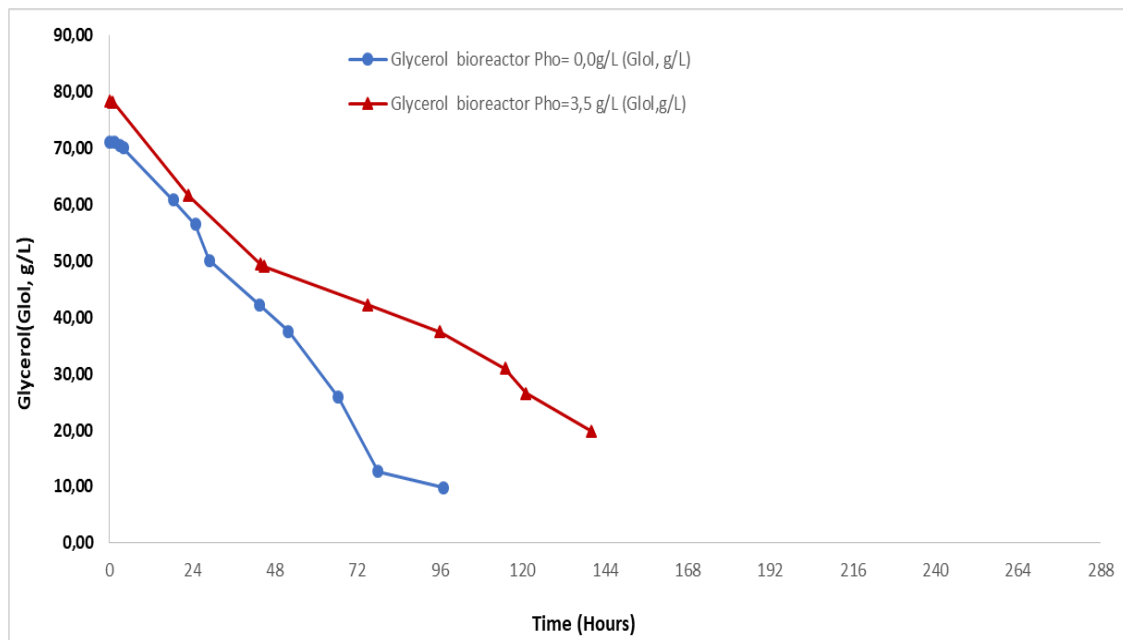
διαφορές η αφομοίωση του υποστρώματος γλυκερόλης μεταξύ των ζυμώνσεων με προσθήκη ΥΑΕ σε ζυμώνσεις βυθού και στον βιοαντιδραστήρα.

- Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα παρατηρούνται πολύ χαμηλότερες μέγιστες τιμές παραγωγής βιομάζας από αυτές στις ζυμώνσεις βυθού. Συγκρίνοντας την βιομάζα στις δύο ζυμώνσεις αναφοράς σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα, η  $X_{max} = 11,3 \text{ g/L}$  στις ζυμώνσεις βυθού και  $X_{max} = 8,0 \text{ g/L}$  στον βιοαντιδραστήρα με  $Y_{X/Glcl}$  0,17 και 0,09 αντίστοιχα. Συγκρίνοντας την βιομάζα στις δύο ζυμώνσεις με συγκέντρωση φαινολικών  $Pho = \sim 3,5 \text{ g/L}$  σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα, η  $X_{max} = 8,3 \text{ g/L}$  στις ζυμώνσεις βυθού και  $X_{max} = 5,1 \text{ g/L}$  στον βιοαντιδραστήρα με  $Y_{X/Glcl}$  0,12 και 0,09 αντίστοιχα. Στις ζυμώνσεις που πραγματοποιήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα η προσθήκη ΥΑΕ επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή βιομάζας.
- Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα παράγονται πολύ λιγότεροι ενδοπολυσακχαρίτες απότι στις ζυμώνσεις βυθού. Η προσθήκη ΥΑΕ στο μέσο της καλλιέργειας δεν επηρεάζει την παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών στον βιοαντιδραστήρα. Τόσο στις ζυμώνσεις αναφοράς όσο και στις ζυμώνσεις με προσθήκη ΥΑΕ στον βιοαντιδραστήρα, η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών φτάνει σταδιακά, στις  $\sim 44$  ώρες μετά τον εμβολιασμό περίπου, σε ποσοστό  $\sim 1,5\%$  βάρος κατά βάρος ξηρής βιομάζας και παραμένει σε  $\sim 1,5\text{-}2\%$  για την διάρκεια της υπόλοιπης ζύμωσης.
- Το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 δεν παρουσιάζει σημαντική ελαιογόνο ικανότητα όταν καλλιέργεται σε υπόστρωμα γλυκερόλης με περιοριστικό στοιχείο αύξησης στον βιοαντιδραστήρα. Η μέγιστη τιμή λίπους που επετεύχθηκε ( $L_{max}$ ) ήταν  $3,1 \text{ g/L}$  στις 164 ώρες ζύμωσης και συντελεστή απόδοσης  $Y_{LX}$  38,5% στην ημισυνεχή τροφοδοτούμενη ζύμωση στον βιοαντιδραστήρα και  $0,9 \text{ g/L}$  στις 44 ώρες ζύμωσης και συντελεστή απόδοσης  $Y_{LX}$  31,1% στην ζύμωση με προσθήκη ΥΑΕ.
- Ως προς την παραγωγή πολυολών, στις ζυμώνσεις που πραγματοποιήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα με το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 παρήχθησαν κατα κύριο λόγο μαννιτόλη και σε μικρές συγκεντρώσεις ερυθριτόλη. Σε σύγκριση με τις ζυμώνσεις βυθού παρήχθησαν πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις, πιθανότατα λόγω στροφής του μεταβολισμού του

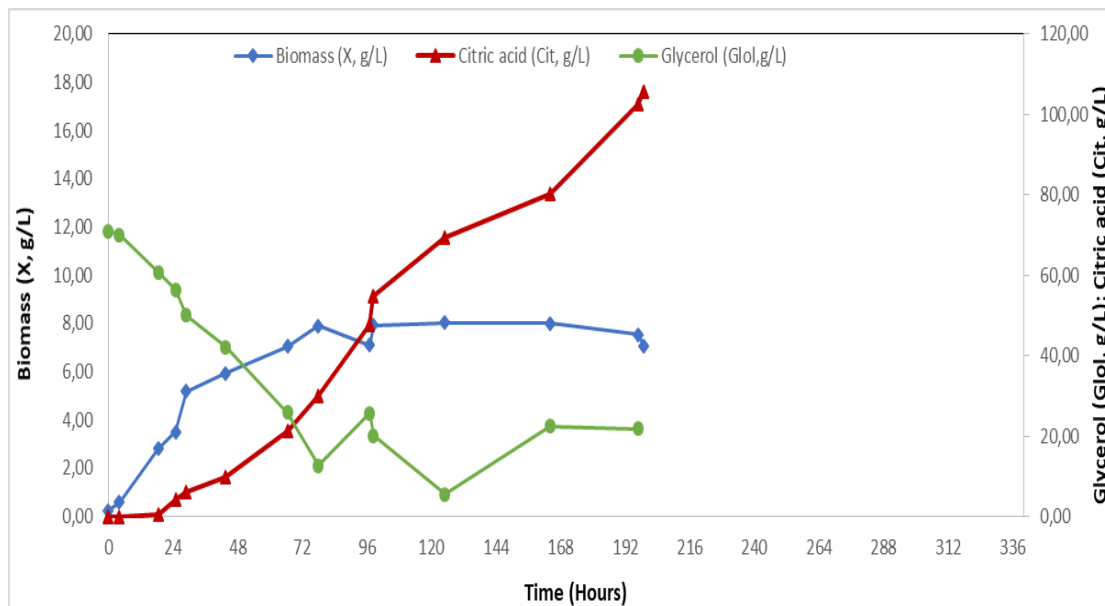
κυττάρου στην παραγωγή κιτρικού οξέος. Δεν παρατηρήθηκε παραγωγή αραβιτόλης. Η μέγιστη τιμή της μαννιτόλης που επετεύχθη ( $Man_{max}$ ) ήταν 6,5 g/L με συντελεστή απόδοσης  $Y_{Man/Glcl} = 0,11$  και παρατηρήθηκε στην ζύμωση με προσθήκη ΥΑΕ, ενώ στις ζυμώσεις βυθού με την ίδια συγκέντρωση φαινολικών η  $Man_{max}$  ήταν 13,1 g/L με συντελεστή απόδοσης  $Y_{Man/Glcl} = 0,19$ . Η μέγιστη παραγωγή της ερυθριτόλης επετεύχθη στις 97 ώρες στην ζύμωση αναφοράς του βιοαντιδραστήρα με  $Ery_{max} = 4,6$  g/L και  $Y_{Ery/Glcl} = 0,08$ .

- Το μεταβολικό προϊόν που παρήχθη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα ήταν το κιτρικό οξύ. Οι μέγιστες τιμές παραγωγής του κιτρικού οξέος που επετεύχθηκαν στις δύο ζυμώσεις στον βιοαντιδραστήρα ήταν μεγαλύτερες από αυτές στις ζυμώσεις βυθού. Στην ζύμωση αναφοράς (batch) στον βιοαντιδραστήρα επετεύχθη μέγιστη συγκέντρωση κιτρικού οξέος  $Cit_{max} = 47,7$  g/L στις 97 ώρες στο τέλος της batch ζύμωσης με συντελεστή απόδοσης  $Y_{Cit/Glcl} = 0,78$ . Στην ζύμωση που συνεχίστηκε ως fed-batch στον βιοαντιδραστήρα επετεύχθη μέγιστη συγκέντρωση κιτρικού οξέος  $Cit_{max} = 105,7$  g/L στις 199 ώρες στο τέλος της ζύμωσης και του πειράματος με συντελεστή απόδοσης  $Y_{Cit/Glcl} = 0,86$ . Πρόκειται για την μεγαλύτερη τιμή παραγωγής κιτρικού οξέος και συντελεστή απόδοσης από όλες τις ζυμώσεις που διενεργήθηκαν στην μελέτη αυτή. Στην ζύμωση με προσθήκη ΥΑΕ στον βιοαντιδραστήρα επετεύχθη  $Cit_{max} = 38,2$  g/L στις 140 ώρες στο τέλος της ζύμωσης με συντελεστή απόδοσης  $Y_{Cit/Glcl} = 0,65$ .
- Στα πειράματα που διενεργήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα διαπιστώνεται η ικανότητα του στελέχους της ζύμης *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 να παράγει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εξωκυτταρικά προϊόντα, κυρίως κιτρικό οξύ και σε μικρότερο βαθμό πολυόλες και σε πολύ μικρότερες να συσσωρεύει ενδοκυτταρικά προϊόντα (ενδο-πολυσακχαρίτες, λιπίδια και βιομάζα), όταν αναπτύσσεται σε υποστρώμα γλυκερόλης με περιοριστικό στοιχείο αύξησης το άζωτο.

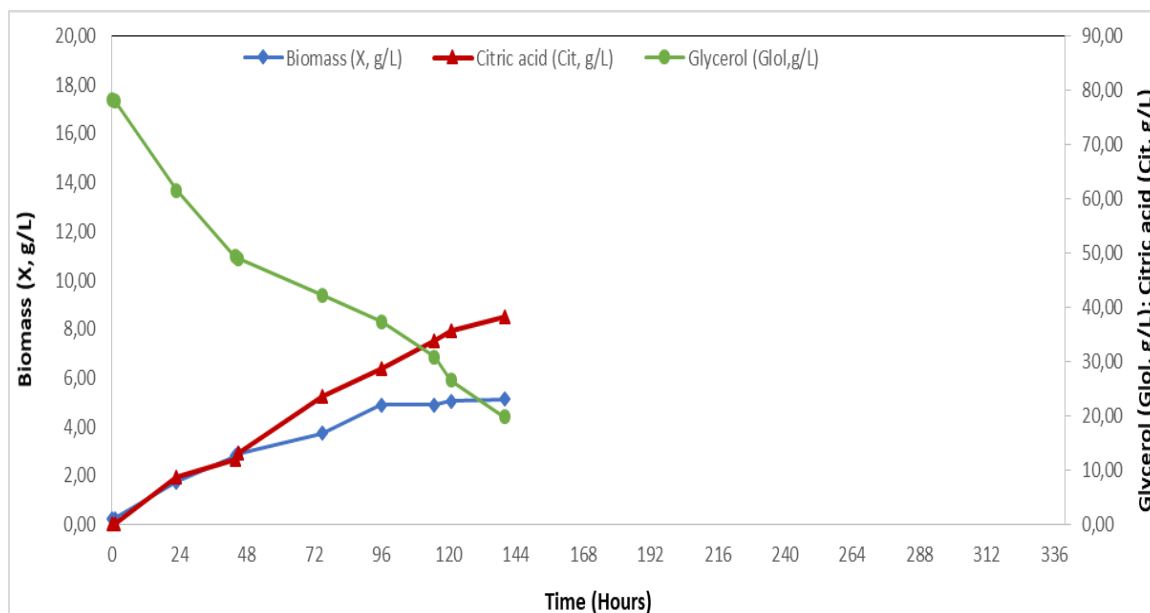
Ακολουθούν τα διαγράμματα της κατανάλωσης της γλυκερόλης, της μεταβολής της βιομάζας και της μεταβολής του κιτρικού οξέος σε συνάρτηση με τον χρόνο, για τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα.



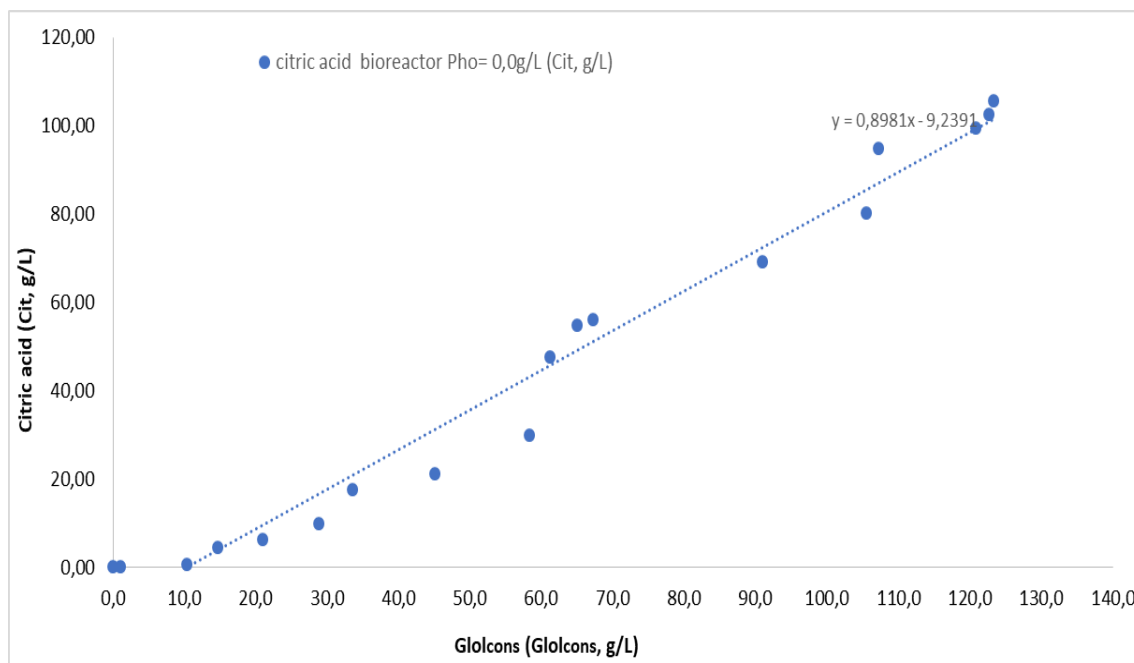
**Γράφημα 3.3.1:** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-ΥC 5032 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης ως προς τον χρόνο ζύμωσης (για ζυμώσεις batch στον βιοαντιδραστήρα με συγκεντρώσεις φαινολικών Ph0= ~0,0g/L και Ph0= ~3,5 g/L ).



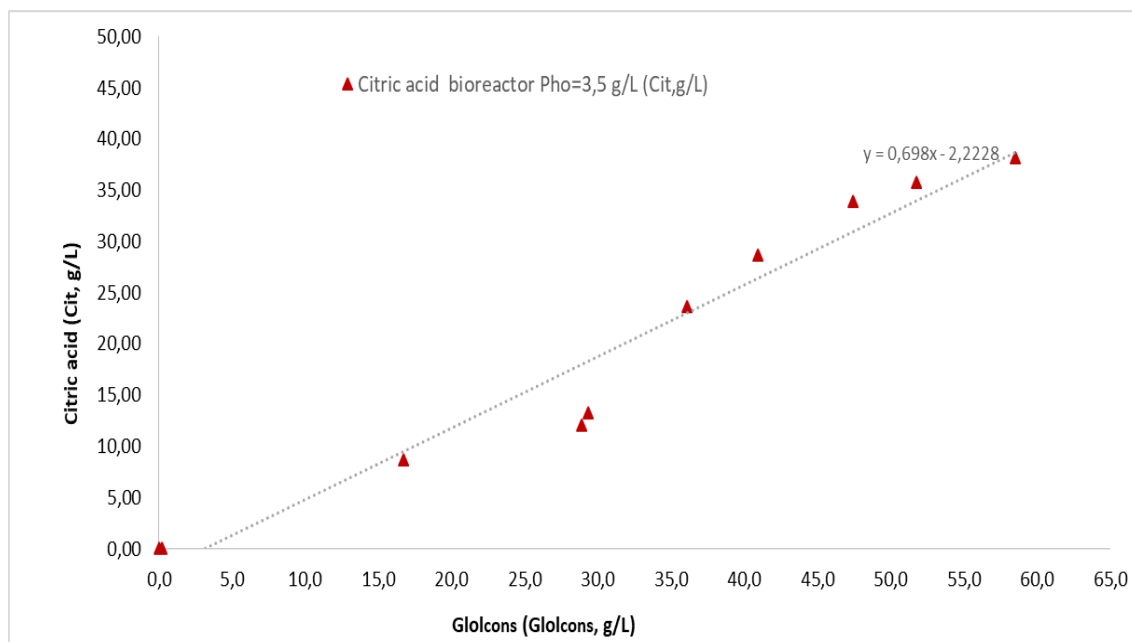
**Γράφημα 3.3.2:** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-ΥC 5032 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης, την μεταβολή της βιομάζας και του κιτρικού οξέος ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση fed-batch σε βιοαντιδραστήρα με συγκέντρωση φαινολικών Ph0= ~0,0g/L- ζύμωση αναφοράς ).



**Γράφημα 3.3.3:** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης, την μεταβολή της βιομάζας και του κιτρικού οξέος ως προς τον χρόνο ζύμωσης (ζύμωση batch σε βιοαντιδραστήρα με συγκέντρωση φαινολικών Ph<sub>0</sub> = ~3,5g/L).



**Γράφημα 3.3.4:** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την συγκέντρωση του κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υποστρώμα γλυκερόλης (ζύμωση fed-batch σε βιοαντιδραστήρα με συγκέντρωση φαινολικών Ph<sub>0</sub> = ~0,0g/L).



**Γράφημα 3.3.5:** Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 με την συγκέντρωση του κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υποστρώμα γλυκερόλης (ζύμωση batch σε βιοαντιδραστήρα με συγκέντρωση φαινολικών Pho= ~3,5g/L).

### 3.4 Ποιοτικός προσδιορισμός της σύστασης του μικροβιακού λίπους που παρήχθηκε στις ζυμώσεις.

Με την βοήθεια της αεριοχρωματογραφίας βρέθηκε ότι το μικροβιακό λίπος, που παράχθηκε και από τα δύο στελέχη *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 και *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032, αποτελείται από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα : παλμιτικό οξύ (C16:0), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ ( $\Delta^9$ C18:1) , λινελαϊκό οξύ ( $\Delta^{9,12}$  C18:2) και α-λινολενικό οξύ ( $\Delta^{9,12,15}$  C18:3). Ακολουθούν πίνακες με τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την βοήθεια της αεριοχρωματογραφίας.

**Πίνακας 3.6:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα των στελεχών *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 και *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 70 g/L, για διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών σε ζυμώσεις βυθού.

Strain	Initial Phenolics (g/L)	Λιπαρά οξέα %						UI
		Time (h)	C16:0	$\Delta^9$ C16:1	C18:0	$\Delta^9$ C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5029	0,00	48	17,4	10,4	6,1	52,6	13,5	0,900
		121	24,7	10,8	8,4	55,4	0,7	0,676
		144	17,6	12,3	6,5	50,3	13,3	0,892
		191	18,0	11,9	5,7	52,0	12,4	0,887
	1,00	145	16,0	11,4	8,0	50,9	13,7	0,897
		217	17,2	11,0	9,2	51,1	11,5	0,851
	2,00	144	11,5	4,5	5,4	61,3	17,3	1,004
		216	16,2	13,6	7,0	50,4	12,8	0,896
	3,50	45	20,0	4,4	6,6	53,9	15,1	0,885
		140	18,3	7,8	7,4	50,6	15,9	0,902
		209	16,7	3,0	6,8	56,4	17,1	0,937
	<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5032	0,00	48	20,3	3,4	10,1	52,7	13,5
121			11,7	11,4	6,6	60,8	9,5	0,912
144			10,6	12,6	5,7	61,6	9,5	0,932
191			11,5	11,7	6,3	60,4	10,1	0,923
1,00		49	9,7	5,0	9,2	65,3	10,8	0,919
		145	9,4	7,5	8,2	68,9	6,0	0,884
		217	10,9	8,2	8,3	65,7	6,9	0,877
2,00		48	10,6	0,3	10,1	65,2	13,8	0,931
		144	13,1	7,4	12,0	60,2	7,3	0,822
		216	12,6	7,1	12,2	61,7	6,4	0,816
3,50		45	12,5	5,4	5,7	62,0	14,4	0,962
		140	11,4	8,0	5,3	62,6	12,7	0,960
	209	11,3	7,2	4,8	62,9	13,8	0,977	

Όπου C16:0: Παλμιτικό οξύ,  $\Delta^9$ C16:1: Παλμιτελαϊκό οξύ, C18:0: Στεατικό οξύ,  $\Delta^9$ C18:1: ελαϊκό οξύ,  $\Delta^{9,12}$ C18:2: Λινελαϊκό οξύ

Από τον Πίνακα 3.6 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλες τις ζυμώσεις είναι το ελαϊκό οξύ ( $\Delta^9$ C18:1) σε ποσοστό που κυμαίνεται από 50,3-68,9 %.
- Ακολουθούν το παλμιτικό οξύ (C16:0) σε ποσοστό 9,4-24,7 %, λινελαϊκό οξύ ( $\Delta^{9,12}$ C18:2) σε ποσοστό 0,7-17,3 %, παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1) σε ποσοστό 0,3-13,6% και στεατικό οξύ (C18:0) σε ποσοστό 4,8-12,2%.
- Με την προσθήκη ΥΑΕ σε μεγαλύτερους όγκους στο υγρό της καλλιέργειας παράγονται λιπίδια με ολοένα μεγαλύτερο ποσοστό σε ελαϊκό οξύ.

**Πίνακας 3.7:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του στελέχους *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 70 g/L, για τις ζυμώσεις που διενεργήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα με αρχικές συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών Pho= 0,0 g/L και Pho= 3,5 g/L.

Strain	Initial Phenolics (g/L)	Λιπαρά Οξέα %						UI
		Time (h)	C16:0	$\Delta^9$ C16:1	C18:0	$\Delta^9$ C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	
<i>Y. lipolytica</i> ACA-YC 5032	0,00	44	16,6	8,3	8,1	56,1	10,9	0,862
		164	11,2	12,7	6,3	59,8	10,1	0,926
		197	10,5	13,2	5,8	59,3	11,2	0,949
<i>Y. lipolytica</i> ACA-YC 5032	3,50	44	13,8	11,8	6,6	57,4	10,4	0,900
		119	15,1	7,3	3,1	53,1	21,3	1,030

Όπου C16:0: Παλμιτικό οξύ,  $\Delta^9$ C16:1: Παλμιτελαϊκό οξύ, C18:0: Στεατικό οξύ,  $\Delta^9$ C18:1: ελαϊκό οξύ,  $\Delta^{9,12}$ C18:2: Λινελαϊκό οξύ.

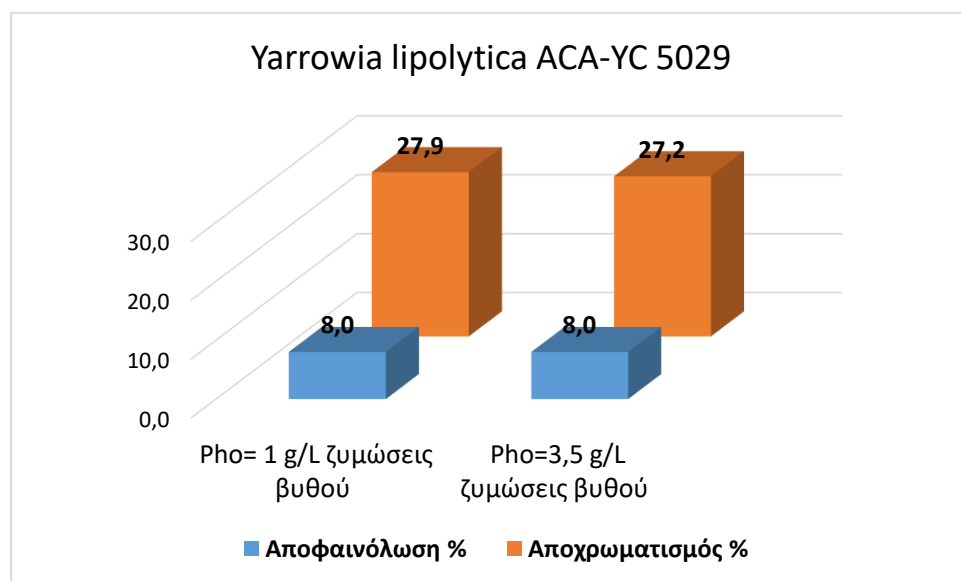
Από τον Πίνακα 3.7 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα είναι το ελαϊκό οξύ ( $\Delta^9$ C18:1) σε ποσοστό που κυμαίνεται από 27,7-59,8 %.
- Ακολουθούν λινελαϊκό οξύ ( $\Delta^{9,12}$  C18:2) σε ποσοστό 4,5-21,3 %, το παλμιτικό οξύ (C16:0) σε ποσοστό 10,5-16,6 %, παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1) σε ποσοστό 5,7-13,2 % και στεατικό οξύ (C18:0) σε ποσοστό 3,1-8,1 %.

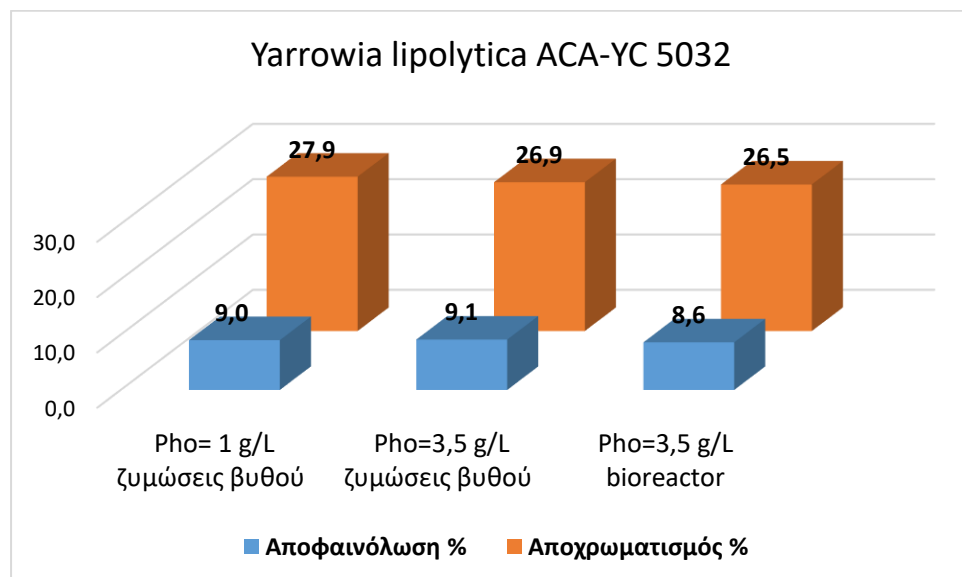


### 3.5 Αποτελέσματα αναλύσεων αποχρωματισμού- αποφαινόλωσης.

Κατα κύριο λόγο τα φυσικά στελέχη των ζυμών δεν έχουν την ικανότητα παραγωγής ενζύμων οξειδωσης των φαινολικών ουσιών (Crognale et al., 2006; Papanikolaou et al., 2008). Παρόλα αυτά στην συγκεκριμένη μελέτη τα στελέχη ζύμης που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις έδειξαν ικανότητα μερικού αποχρωματισμού (η προσθήκη ΥΑΕ προσδίδει στο υγρό ζύμωσης σκούρο χρώμα) και αποφαινόλωσης. Συγκεκριμένα σε όλες τις ζυμώσεις και με τα δύο στελέχη *Yarrowia lipolytica* που χρησιμοποιήθηκαν, επετεύχθη αποφαινόλωση σε ποσοστό ~10% (~0.4 g/L μέγιστη αφαίρεση φαινολικών στις καλλιέργειες με συγκέντρωση φαινολικών  $Ph_0 = \sim 3.5$  g/L) και αποχρωματισμός της τάξης του ~30% σε σύγκριση με την σύσταση του υγρού ζύμωσης στην αρχή της ζύμωσης. Η ικανότητα αυτή των στελεγχών που χρησιμοποιήθηκαν να αποφαινόλουν το υγρό της ζύμωσης (και κατά συνέπεια να αποχρωματίζουν) τους προσδίδει βιοαπορρυπαντικές ιδιότητες (Aggelis et al., 2003; Lanciotti et al., 2005; Crognale et al., 2006). Ο μηχανισμός της αποφαινόλωσης πιθανότατα οφείλεται στην μερική προσρόφηση των φαινολικών ουσιών στα κύτταρα της ζύμης (προσρόφηση ανθοκυανίνων στα κυτταρικά τοιχώματα της ζύμης) (Rizzo et al., 2006) ή στην χρήση των φαινολικών ουσιών σαν πηγή άνθρακα και ενέργειας για τις ανάγκες της ζύμης (Chtourou et al., 2004).



**Γράφημα 3.5.1:** Ποσοστό αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού που επετεύχθη με το στέλεχος *Y. lipolytica* ACA-YC 5029 στις ζυμώσεις βυθού με συγκέντρωση φαινολικών Ph<sub>0</sub>= ~1 g/L και Ph<sub>0</sub>= ~3,5 g/L αντίστοιχα.



**Γράφημα 3.5.2:** Ποσοστό αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού που επετεύχθη με το στέλεχος *Y. lipolytica* ACA-YC 5032 στις ζυμώσεις βυθού με συγκέντρωση φαινολικών Ph<sub>0</sub>= ~1 g/L και Ph<sub>0</sub>= ~3,5 g/L και στην ζύμωση με Ph<sub>0</sub>= ~3,5 g/L στον βιοαντιδραστήρα.

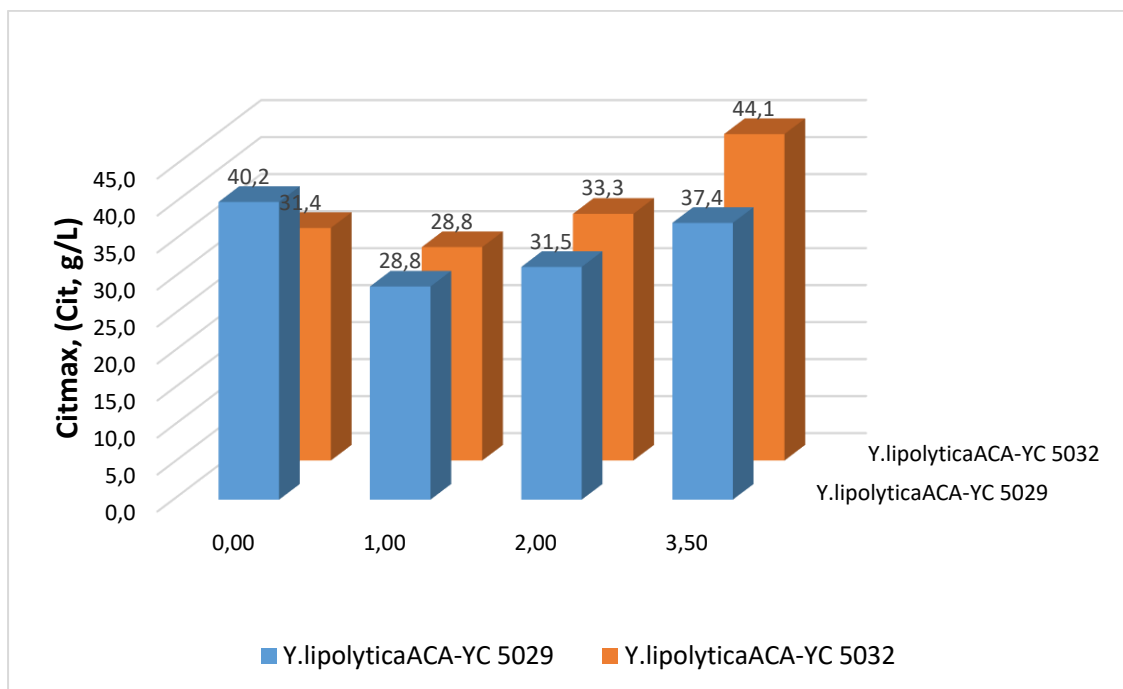
## **4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η ικανότητα των στελεχών ACA-YC 5029 και ACA-YC 5032, της ζύμης *Yarrowia lipolytica*, να αναπτύσσεται σε υποστρώματα με βιομηχανική γλυκερόλη αραιωμένη σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) κατά τέτοιο τρόπο ώστε τα ΥΑΕ, όντας υγρό ζύμωσης και υπόστρωμα, να δύνανται να υποκαταστήσουν, τουλάχιστον εν μέρει, το νερό ζύμωσης που θα χρησιμοποιείται στις αναφερθείσες βιοδιεργασίες. Για πρώτη φορά μελετάται η ικανότητα της *Yarrowia lipolytica* να αναπτύσσεται σε συνδυασμό ΥΑΕ-βιομηχανικής (ακάθαρτης) γλυκερόλης για την παραγωγή βιομάζας, μεταβολικών προϊόντων (πολυολών και κιτρικού οξέος) και δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακό λίπος και ενδοπολυσακχαρίτες) και παράλληλα να πραγματοποιείται αποχρωματισμός και αποφαινόλωση του υγρού της ζύμωσης. Παρόμοιες έρευνες έως τώρα έχουν γίνει, μελετώντας την ανάπτυξη στελεχών ζυμών σε συνδυασμό υποστρωμάτων ΥΑΕ-καθαρής γλυκερόλης (Dourou et al., 2016), ή ΥΑΕ- γλυκόζης (Sarris et al., 2015).

Στις ζυμώσεις που διενεργήθηκαν σε υπόστρωμα ΥΑΕ-βιομηχανικής γλυκερόλης και τα δύο στελέχη ζύμης που επιλέχθηκαν έδειξαν ικανοποιητική ανάπτυξη. Μέχρι και σε συγκεντρώσεις φαινολικών  $\sim 2,0$  g/L, η παραγωγή βιομάζας δεν επηρεάζεται σημαντικά συγκριτικά με τις ζυμώσεις αναφοράς (blank), ενώ στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών  $\sim 3,5$  g/L, η παραγωγή βιομάζας ήταν χαμηλότερη ( $X_{\max} \sim 8,76$  g/L,  $Y_{X/Glcl} \sim 0,13$ ,  $X_{\max} \sim 8,28$  g/L,  $Y_{X/Glcl} \sim 0,12$  g/g για το 5029 και το 5032 αντίστοιχα, έναντι  $X_{\max} \sim 12,28$  g/L,  $Y_{X/Glcl} \sim 0,20$  g/g,  $X_{\max} \sim 11,34$  g/L,  $Y_{X/Glcl} \sim 0,17$  g/g για το 5029 και 5032 αντίστοιχα στις ζυμώσεις αναφοράς). Σε παρόμοιες μελέτες όπου χρησιμοποιούνταν το στέλεχος *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 για ζύμωση σε υπόστρωμα γλυκόζης-ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις  $Ph_0 \sim 0.7-1.8$  g/L (Papanikolaou et al., 2008), το στέλεχος *S. cerevisiae* MAK 1 σε υπόστρωμα ΥΑΕ-μελάσσας σε συγκεντρώση φαινολικών  $Ph_0 \sim 2.6-6.3$  g/L (Sarris et al., 2014), επιλεγμένα στελέχη του Zygomycetes (*Mortierella isabellina* MUCL 15102, *M. ramanniana* MUCL 9235, *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411, *Mucor* sp. LGAM 365, *Thamnidium elegans* CCF-1465 και *Zygorhynchus moelleri* MUCL 1430) για ζύμωση σε αρχικό υπόστρωμα με προσθήκη ΥΑΕ σε όγκους έως και 50% (v/v) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην παραγωγή βιομάζας (Bellou et al., 2014). Αντιθέτως σε μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Y. lipolytica* ACA-YC 5033 σε υγρό υπόστρωμα ΥΑΕ- εμπορικής γλυκόζης σε αυξανόμενες

συγκεντρώσεις φαινολικών έως και  $Ph_0 \sim 1,8-2,0$  g/L, η παραγωγή βιομάζας σχεδόν μηδενιζόταν όσο αυξανόταν η συγκέντρωση των φαινολικών στο μέσο της καλλιέργειας (Sarris et al., 2017). Σε άλλες μελέτες με στελέχη της *Y. lipolytica* σε αρχικό υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης εμπλουτισμένης με ΥΑΕ δύο από αυτά (*Y. lipolytica* strain ACA-YC 5028 και ACA-YC 5033) σε συγκεντρώσεις φαινολικών  $Ph_0 \sim 1,0-1,6$  g/L η ανάπτυξη τους επηρεάστηκε αρνητικά από την προσθήκη ΥΑΕ, ενώ το τρίτο στέλεχος (*Y. lipolytica* strain W29) αυξανόταν περισσότερο όσο αυξανόταν η συγκέντρωση των φαινολικών στο πείραμα (Sarris et al., 2011). Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αντοχή των ζυμών σε διάφορες συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών εξαρτάται από το επιλεγμένο στέλεχος. Η προσθήκη ΥΑΕ στις ζυμώσεις βυθού έχει σαν αποτέλεσμα πιο γρήγορες κινητικές όσον αφορά την κατανάλωση του υποστρώματος. Μάλιστα η κατανάλωση του υποστρώματος επιταχύνεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών (Ταχύτερη αφομοίωση της ακάθαρτης γλυκερόλης έναντι αφομοίωσης στην ζύμωση αναφοράς). Σε όλες τις περιπτώσεις το υπόστρωμα αφομοιώθηκε πλήρως.

Στην βιβλιογραφία τα ευρήματα σχετικά με την παραγωγή του κιτρικού οξέος σε ζυμώσεις με υπόστρωμα που γίνεται προσθήκη ΥΑΕ εμφανίζουν αρκετή ποικιλομορφία (Papanikolaou et al., 2008; Sarris et al., 2011; Dourou et al., 2016; Sarris et al., 2017). Σε κάποιες μελέτες η παραγωγή του κιτρικού οξέος δεν επηρεάζεται από την προσθήκη ΥΑΕ στο μέσο της καλλιέργειας (Sarris et al., 2011; Sarris et al., 2017). Σε άλλες η παραγωγή του κιτρικού μειώνεται με την προσθήκη ΥΑΕ (Sarris et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη η παραγωγή του κιτρικού οξέος στις ζυμώσεις βυθού αυξάνεται για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032, σε σχέση με αυτήν στην ζύμωση αναφοράς σε συγκέντρώσεις  $Ph_0 \sim 2,0-3,5$  g/L, ενώ για το ACA-YC 5029 μειώνεται όπως φαίνεται στο γράφημα 4.1. Στο ίδιο γράφημα φαίνεται ότι η προσθήκη ΥΑΕ στο υπόστρωμα σε υψηλότερους όγκους και άρα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών φαίνεται να ευνοεί την συσσώρευση κιτρικού οξέος συγκριτικά με τις ζυμώσεις με χαμηλότερη συγκέντρωση φαινολικών και άρα χαμηλότερους όγκους ΥΑΕ.



**Γράφημα 4.1:** Μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος ( $Cit_{max}$ ) στις ζυμώσεις βυθού, από τα δύο στελέχη *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029, ACA-YC 5032 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινολικών.

Σε βιομηχανική κλίμακα κάτι τέτοιο είναι πολύ σημαντικό για μία ενδεχόμενη βιοδιεργασία παραγωγής κιτρικού οξέος, αφού θα μπορούσε να αντικατασταθεί μερικώς ή και ολικώς το νερό που χρησιμοποιείται για την αραίωση της γλυκερόλης στο υγρό της ζύμωσης, καθιστώντας την όλη βιοδιεργασία πιο οικονομική. Συγκρίνοντας τις τιμές του μέγιστου κιτρικού οξέος που παρήχθη στα πειράματα αυτής της μελέτης (υπόστρωμα γλυκερόλης-YAE) με την βιβλιογραφία (όπου σαν πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε γλυκερόλη χωρίς προσθήκη YAE) θα μπορούσε να ειπωθεί ότι αυτές είναι αρκετά χαμηλές. Αντιθέτως συγκρίνοντας την παραγωγή του κιτρικού οξέος της μελέτης με άλλες όπου το υπόστρωμα ήταν συνδυασμός YAE εμπλουτισμένο με κάποια άλλη πηγή άνθρακα, κρίνονται από τις υψηλότερες. Η μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος  $Cit_{max}$  που παρατηρήθηκε στην μελέτη σε ζυμώσεις βυθού ήταν για το *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 44,1 g/L ( $Y_{Cit/Glcl}=0,65$  g/g) σε συγκέντρωση φαινολικών ~3.5 g/L. Σε άλλη μελέτη με το στέλεχος *Y. lipolytica* LGAM S σε υπόστρωμα YAE-καθαρής γλυκερόλης η αντίστοιχη  $Cit_{max}$  ήταν 30,3 g/L ( $Y_{Cit/Glcl}=0,62$  g/g) (Dourou et al., 2016). Σε ζύμωση με το στέλεχος *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 σε υπόστρωμα YAE-εμπορικής γλυκόζης η  $Cit_{max}$  ήταν 28,9 g/L ( $Y_{Cit/Glcl}=0,53$  g/g). Παρόμοια με τα στελέχη *Y. lipolytica* W29 και *Y. lipolytica* ACA-

YC 5033 σε υπόστρωμα ΥΑΕ- εμπορικής γλυκόζης, η  $C_{itmax}$  που επετεύχθη ήταν 15,8 g/L ( $Y_{Cit/Glcl}=0.46$  g/g) and 52,0 g/L ( $Y_{Cit/Glcl}=0.64$  g/g) αντίστοιχα (Sarris et al., 2011).

Τα στελέχη *Y. lipolytica* ACA-YC 5029 και ACA-YC 5032 μπόρεσαν να παράξουν τις πολυόλες αραβιτόλη, ερυθριτόλη, μαννιτόλη τόσο στις ζυμώσεις αναφοράς (μόνο γλυκερόλη) όσο και σε αυτές με προσθήκη ΥΑΕ (για τις ζυμώσεις με προσθήκη ΥΑΕ:  $Man_{max}=13,1$  g/L;  $Y_{Man/Glcl}=0,21$  g/g;  $Ara_{max}=3,1$  g/L;  $Y_{Ara/Glcl}=0,05$  g/g;  $Ery_{max}=13,5$  g/L;  $Y_{Ery/Glcl}=0,19$  g/g για το 5029, και  $Man_{max}=13,1$  g/L;  $Y_{Man/Glcl}=0,19$  g/g;  $Ara_{max}=6,8$  g/L;  $Y_{Ara/Glcl}=0,15$  g/g;  $Ery_{max}=15,0$  g/L;  $Y_{Ery/Glcl}=0,25$  g/g για το 5032). Η παραγωγή της μαννιτόλης ( $Man_{max}$ ) και της αραβιτόλης δεν επηρεάζεται σημαντικά στις ζυμώσεις με προσθήκη κατσίγαρου, συγκριτικά με την παραγωγή στις ζυμώσεις αναφοράς. Αντιθέτως η παραγωγή της ερυθριτόλης μειώθηκε δραστικά στις ζυμώσεις με προσθήκη ΥΑΕ σε μεγάλους όγκους ( $Ery_{max}=2,4$  g/L,  $Y_{Ery/Glcl}=0,04$  g/g;  $Ph_0\sim 3,5$  g/L για το 5029 και  $Ery_{max}=2,2$  g/L,  $Y_{Ery/Glcl}=0,04$  g/g;  $Ph_0\sim 3,5$  g/L για το 5032 αντίστοιχα) σε σχέση με τις ζυμώσεις αναφοράς ( $Ery_{max}=9,8$  g/L,  $Y_{Ery/Glcl}=0,16$  g/g για το 5029 και  $Ery_{max}=11,1$  g/L,  $Y_{Ery/Glcl}=0,21$  g/g για το 5032 αντίστοιχα). Παρατηρείται μία στροφή του μεταβολισμού του κυττάρου στην παραγωγή κιτρικού οξέος εις βάρος της παραγωγής ερυθριτόλης στις ζυμώσεις με προσθήκη ΥΑΕ [εκτός από τις ζυμώσεις με συγκεντρώσεις φαινολικών  $\sim 2.0$  g/L, όπου η  $Ery_{max}$  ήταν 13.5 ( $Y_{Ery/Glcl}=0.19$  g/g) για το 5029 και η  $Ery_{max}$  ήταν 15,0 ( $Y_{Ery/Glcl}=0,25$  g/g) για το 5032]. Το περίεργο αυτό μοτίβο που ακολουθεί η παραγωγή της ερυθριτόλης δεν μπορεί να εξηγηθεί περαιτέρω, μιας και πρόκειται για την πρώτη μελέτη όπου πραγματοποιούνται ζυμώσεις σε υπόστρωμα ΥΑΕ-ακάθαρτης γλυκερόλης (εκτός από την μελέτη Dourou et al., 2005 όπου όμως το αρχικό υπόστρωμα ήταν συνδυασμός ΥΑΕ-καθαρής γλυκερόλης).

Τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, δεν παρουσιάζουν σημαντική ελαιογόνο ικανότητα όταν καλλιεργούνται σε υπόστρωμα γλυκερόλης με περιοριστικό στοιχείο αύξησης το άζωτο (Papanikolaou et al., 2009; Papanikolaou and Aggelis, 2010; Athenaki et al., 2018; Carsanba et al., 2018). Παρότι γενικά η προσθήκη ΥΑΕ στο υποστρώμα της ζύμωσης, θα έπρεπε θεωρητικά να αναστέλλει την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, λόγω των φαινολικών ενώσεων που περιέχει, στην παρούσα μελέτη κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε. Η μέγιστη τιμή λίπους έφτασε σε 2 g/L σε  $Ph_0\sim 2$  g/L και για τα δύο στελέχη, ( $Y_{LX} 20\%$  για το στέλεχος 5029 και  $Y_{LX} 13,1\%$  για το 5032). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να συμπληρώσουν τα ευρήματα άλλων

μελετών, στις οποίες καταδεικνύεται η θετική επίδραση της προσθήκης ΥΑΕ στην συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους σε ζυμώσεις διαφόρων μικροοργανισμών (Papanikolaou et al., 2008; Sarris et al., 2011;). Εκτός από στελέχη *Y. lipolytica* και άλλα στελέχη ελαιογόνων μικροοργανισμών (π.χ *Zygomycetes*) επιδεικνύουν την ίδια ελαιογόνο ικανότητα όταν αναπτύσσονται σε υποστρώματα με προσθήκη ΥΑΕ (Bellou et al., 2014). Έτσι λοιπόν θα μπορούσε να ειπωθεί ότι ο κατσίγαρος-ΥΑΕ αποτελεί ένα «ελαιογόνο» υπόστρωμα. Παρόμοια παραδείγματα όπου η προσθήκη φυσικών ουσιών-βοτάνων (π.χ υδατικά διαλύματα *Teucrium polium*, *Origanum* κ.α) στο υπόστρωμα των ζυμώσεων, διευκολύνει την συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους συναντιούνται στην βιβλιογραφία και παρουσιάζουν τεράστιο οικονομικό και ακαδημαϊκό ενδιαφέρον (Aggelis et al., 1999; Chatzifragkou et al., 2011).

Στην συγκεκριμένη μελέτη τα στελέχη ζύμης που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις έδειξαν ικανότητα μερικού αποχρωματισμού (η προσθήκη ΥΑΕ προσδίδει στο υγρό ζύμωσης σκούρο χρώμα) και αποφαινόλωσης. Σε όλες τις ζυμώσεις βυθού που πραγματοποιήθηκαν και με τα δύο στελέχη *Y. lipolytica* που επιλέχθηκαν, επετεύχθη αποφαινόλωση της τάξης του ~10% w/w και αποχρωματισμός έως και ~30% w/w, συγκριτικά με την σύσταση του υποστρώματος στην αρχή της ζύμωσης. Η δυνατότητα αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού φαίνεται ότι είναι χαρακτηριστικό του στελέχους που χρησιμοποιείται κάθε φορά στην ζύμωση. Στελέχη για παράδειγμα που ανήκουν στα γένη *Saccharomyces* και *Yarrowia* παρουσιάζουν ικανότητα αποχρωματισμού και σε μικρότερο βαθμό αποφαινόλωσης του υγρού της ζύμωσης, ενώ (Lanciotti et al., 2005; D'Annibale et al., 2006; Papanikolaou et al., 2008; Sarris et al., 2011; Sarris et al., 2013; Sarris et al., 2014; Sarris et al., 2017;), ενώ άλλα δεν παρουσιάζουν τέτοια ικανότητα όταν αναπτύσσονται σε υποστρώματα με προσθήκη ΥΑΕ (De Felice et al., 1997; Sciolli et al., 1997; Dourou et al., 2016). Άλλα παραδείγματα μικροοργανισμών που συναντούνται στην βιβλιογραφία με δυνατότητα βιοαπορρύπανσης υποστρωμάτων με προσθήκη ΥΑΕ είναι οι εξής: *Geotrichum candidum* (Garcia et al., 2000; Assas et al., 2002; Aissam et al., 2007), *Pleurotus ostreatus* (Aggelis et al., 2003), *Aspergillus niger* (Garcia et al., 2000; Crognale et al., 2006), *Candida boidinii* (Aissam et al., 2007), *Yarrowia lipolytica* (Lanciotti et al., 2005; Crognale et al., 2006; Ergül et al., 2011) και *Saccharomyces cerevisiae* (Sarris et al., 2013; Sarris et al., 2014). Οι ανώτεροι μύκητες παρουσιάζουν την ικανότητα



οξειδωσης των φαινολικών ουσιών, λόγω των εξωκυτταρικών ενζύμων (λιγνολυτικών ενζύμων) που εκκρίνουν όπως λακκάσες, υπεροξειδάσες λιγνίνης και υπεροξειδάσες του μαγγανίου (Aggelis et al., 2003; Fountoulakis et al., 2003; Crognale et al., 2006). Τα στελέχη των ζυμών δεν έχουν την δυνατότητα παραγωγής τέτοιων ενζύμων για να οξειδώνουν τις φαινολικές ενώσεις (Aggelis et al., 2003; Fountoulakis et al., 2003; Zerva et al., 2007; Lakhtar et al., 2010). Ο μηχανισμός της αποφαινώσεως στα στελέχη των ζυμών πιθανότατα οφείλεται στην μερική προσρόφηση των φαινολικών ουσιών στα κύτταρα της ζύμης (προσρόφηση ανθοκυανίνων στα κυτταρικά τοιχώματα της ζύμης) (Rizzo et al., 2006) ή στην χρήση των φαινολικών ουσιών σαν πηγή άνθρακα και ενέργειας για τις ανάγκες της ζύμης (Chtourou et al., 2004). Μπορεί παρόλα αυτά να γίνει βιοτεχνολογικά η παραγωγή λακκασών με γενετική μηχανική σε στελέχη *Y. Lipolytica* (Jolivalt et al., 2005).

Στις ζυμώσεις που διενεργήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα το στέλεχος *Y.lipolytica* ACA-YC 5032 που επιλέχθηκε έδειξε ικανοποιητική ανάπτυξη. Παρόλα αυτά, υπάρχει σαφής διαφορά φυσιολογίας στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα απο αυτές στις κωνικές φιάλες. Η παραγωγή βιομάζας στις ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα είναι πολύ χαμηλότερη απο αυτήν στις ζυμώσεις βυθού. Παρατηρούνται πολύ χαμηλότερες μέγιστες τιμές παραγωγής βιομάζας απο αυτές στις ζυμώσεις βυθού. Συγκρίνοντας την βιομάζα στις δύο ζυμώσεις αναφοράς σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα, η  $X_{max} = 11,3$  g/L στις ζυμώσεις βυθού και  $X_{max} = 8,0$  g/L στον βιοαντιδραστήρα με  $Y_{X/Glcl}$  0,17 και 0,09 αντίστοιχα. Συγκρίνοντας την βιομάζα στις δύο ζυμώσεις με συγκέντρωση φαινολικών  $Pho = \sim 3,5$  g/L σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα, η  $X_{max} = 8,3$  g/L στις ζυμώσεις βυθού και  $X_{max} = 5,1$  g/L στον βιοαντιδραστήρα με  $Y_{X/Glcl}$  0,12 και 0,09 αντίστοιχα. Στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα η προσθήκη YAE επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή βιομάζας.

Το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 δεν παρουσιάζει σημαντική ελαιογόνο ικανότητα όταν καλλιέργεται σε υπόστρωμα γλυκερόλης με περιοριστικό στοιχείο αύξησης στον βιοαντιδραστήρα. Η μέγιστη τιμή λίπους που επετεύχθηκε ( $L_{max}$ ) ήταν 3,1 g/L στις 164 ώρες ζύμωσης και συντελεστή απόδοσης  $Y_{L/X}$  38,5% στην ζύμωση

αναφοράς στον βιοαντιδραστήρα και 0,9 g/L στις 44 ώρες ζύμωσης και συντελεστή απόδοσης  $Y_{L/X}$  31,1% στην ζύμωση με προσθήκη YAE.

Ως προς την παραγωγή πολυολών, στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα με το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032 παρήχθησαν κατά κύριο λόγο μαννιτόλη και σε μικρές συγκεντρώσεις ερυθριτόλη. Σε σύγκριση με τις ζυμώσεις βυθού παρήχθησαν πολυόλες σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις, πιθανότατα λόγω στροφής του μεταβολισμού του κυττάρου στην παραγωγή κιτρικού οξέος. Δεν παρατηρήθηκε παραγωγή αραβιτόλης. Η μέγιστη τιμή της μαννιτόλης που επετεύχθη ( $Man_{max}$ ) ήταν 6,5 g/L με συντελεστή απόδοσης  $Y_{Man/Glcl}$  = 0,11 και παρατηρήθηκε στην ζύμωση με προσθήκη YAE, ενώ στις ζυμώσεις βυθού με την ίδια συγκέντρωση φαινολικών η  $Man_{max}$  ήταν 13,1 g/L με συντελεστή απόδοσης  $Y_{Man/Glcl}$  = 0,19. Στον βιοαντιδραστήρα η παραγωγή μαννιτόλης είναι μειωμένη σε σχέση με τις φιάλες πιθανότατα λόγω μεγάλης παραγωγής κιτρικού οξέος. Η μέγιστη παραγωγή της ερυθριτόλης επετεύχθη στις 97 ώρες στην ζύμωση αναφοράς του βιοαντιδραστήρα με  $Ery_{max}$  = 4,6 g/L και  $Y_{Ery/Glcl}$  = 0,08.

Το μεταβολικό προϊόν που παρήχθη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα ήταν το κιτρικό οξύ. Οι μέγιστες τιμές παραγωγής του κιτρικού οξέος που επετεύχθηκαν στις δύο ζυμώσεις στον βιοαντιδραστήρα ήταν μεγαλύτερες από αυτές στις ζυμώσεις βυθού. Στην ζύμωση αναφοράς (batch) στον βιοαντιδραστήρα επετεύχθη μέγιστη συγκέντρωση κιτρικού οξέος  $Cit_{max}$  = 47,7 g/L στις 97 ώρες στο τέλος της batch ζύμωσης με συντελεστή απόδοσης  $Y_{Cit/Glcl}$  = 0,78. Στην ζύμωση που συνεχίστηκε ως fed-batch στον βιοαντιδραστήρα επετεύχθη μέγιστη συγκέντρωση κιτρικού οξέος  $Cit_{max}$  = 105,7 g/L στις 199 ώρες στο τέλος της ζύμωσης και του πειράματος με συντελεστή απόδοσης  $Y_{Cit/Glcl}$  = 0,86. Πρόκειται για την μεγαλύτερη τιμή παραγωγής κιτρικού οξέος και συντελεστή απόδοσης από όλες τις ζυμώσεις που διενεργήθηκαν στην μελέτη αυτή. Στην βιβλιογραφία τα αποτελέσματα σχετικά με την παραγωγή κιτρικού οξέος σε ζυμώσεις στον βιοαντιδραστήρα εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία. Ζυμώσεις που να έγιναν σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης- YAE δεν συναντιούνται. Σε ασυνεχείς ζυμώσεις όπου η πηγή άνθρακα ήταν ακάθαρτη γλυκερόλη (χωρίς προσθήκη YAE) και χρησιμοποιήθηκαν μικροοργανισμοί όπως μεταλλαγμένα στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* (Wratislavia 1.31, Wratislavia AWG7 και Wratislavia K1) η παραγωγή κιτρικού οξέος έφθασε σε τιμές 124,5 g/l, 88,1 g/l και

75,7 g/L αντίστοιχα με συντελεστή απόδοσης ( $Y_{Cit/Glcl}$ ) 0,62 g/g, 0,46 g/g και 0,40 g/g αντίστοιχα (Rymowicz et al., 2006). Πάλι σε ασυνεχείς ζυμώσεις με στελέχη *Y. lipolytica* A-101-1.22 σε ακάθαρτη γλυκερόλη, η μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος έφθασε τα 112 g/L με  $Y_{Cit/Glcl} = 0,60$  g/g (Rymowicz et al., 2010). Σε ημισυνεχείς τροφοδοτούμενες όπου η πηγή άνθρακα ήταν ακάθαρτη γλυκερόλη και χρησιμοποιήθηκαν μικροοργανισμοί όπως μεταλλαγμένα στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* (Wratislavia 1.31, Wratislavia AWG7 και NG40/UV7) η παραγωγή κιτρικού οξέος έφθασε σε τιμές 126,0 g/l, 157,5 g/l και 112,0 g/L αντίστοιχα με συντελεστή απόδοσης ( $Y_{Cit/Glcl}$ ) 0,63 g/g, 0,58 g/g και 0,90 g/g αντίστοιχα (Rywińska et al., 2010b; Morgunov et al., 2013). Σε συνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης με τα στελέχη Wratislavia AWG7 η μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος έφθασε σε σχετικά πιο χαμηλές τιμές 86,5 g/L και 63,3 g/L αντίστοιχα με συντελεστή απόδοσης ( $Y_{Cit/Glcl}$ ) 0,59 g/g και 0,67 αντίστοιχα (Rywińska et al., 2011).

Απο τις αναλύσεις αποφαινόλωσης-αποχρωματισμού στον βιοαντιδραστήρα στην ζύμωση με  $P_{ho} \sim 3,5$  g/L βρέθηκαν παρόμοια αποτελέσματα όπως και στις ζυμώσεις στις φιάλες. Επετεύχθη αποφαινόλωση σε ποσοστό  $\sim 10\%$  w/w (8,6%) και αποχρωματισμός έως και  $\sim 27\%$  w/w (26,5%), συγκριτικά με την σύσταση του υποστρώματος στην αρχή της ζύμωσης.

Στον Πίνακα 4.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την παραγωγή κιτρικού οξέος που επετεύχθη κατά την ανάπτυξη στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* σε μίγματα γλυκερόλης.

**Πίνακας 4.1:** Βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την παραγωγή κιτρικού οξέος που επετεύχθη κατά την ανάπτυξη στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* σε μίγματα γλυκερόλης.

Strain	Citric acid (g/L)	Glycerol type	Yield (g/g)	Fermentation type	Reference
ACA-DC 50109	33,6	Crude	0,44	Shake flasks	Papanikolaou et al. (2002a)
Wratisslavia 1.31	124,5	»	0,62	Batch bioreactor	Rymowicz et al. (2006)
Wratisslavia AWG7	88,1	»	0,46	»	»
Wratisslavia K1	75,7	»	0,4	»	»
NRRL YB-423	21,6	Pure	0,55	Shake flasks	Levinson et al. (2007)
NCIM 3589	77,4	Crude	n. r	»	Imandi et al. (2007)
ACA-DC 50109	62,5	»	0,56	»	Papanikolaou et al. (2008)
A-101-1.22	112,0	»	0,6	Batch bioreactor	Rymowicz et al. (2010)
ACA-YC 5033	50,1	»	0,44	Shake flasks	André et al. (2009)
A-101	66,5	Pure	0,44	Batch bioreactor	Rywinska et al. (2010a)
A-101	66,8	Crude	0,43	»	»
Wratisslavia K1	53,3	Pure	0,34	»	»
Wratisslavia K1	36,8	Crude	0,25	»	»
Wratisslavia 1.31	126,0	»	0,63	Fed-batch bioreactor	Rywinska et al. (2010b)
Wratisslavia AWG7	157,5	»	0,58	»	»
Wratisslavia 1.31	155,2	»	0,55	»	»
Wratisslavia AWG7	154,0	»	0,78	Repeated batch	Rywinska and Rymowicz (2010)
N15	19,1	Pure	0,55	Shake flasks	Kamzolova et al. (2011)
N15	98,0	»	0,7	Fed-batch bioreactor	»
Wratisslavia AWG7	86,5	»	0,59	Continuous bioreactor	Rywinska et al. (2011)
Wratisslavia AWG7	63,3	»	0,67	»	»
NG40/UV7	115,0	»	0,64	Fed-batch bioreactor	Morgunov et al. (2013)
NG40/UV7	112,0	Crude	0,9	»	»
JMY1203	57,7	»	0,92	Shake flasks	Papanikolaou et al. (2013)
ACA-YC 5029	40,2	Crude	0,6	»	Present study
ACA-YC 5032	44,1	Crude-OMW	0,65	»	»
ACA-YC 5032	105,7	Crude	0,86	Fed-batch bioreactor	»

n. r.: Not reported in the paper

Συνοψίζοντας προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα από την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη:

- Και τα δύο στελέχη της ζύμης *Y.lipolytica* μπόρεσαν να αυξηθούν σε ικανοποιητικά επίπεδα σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης-YAE.
- Σε όλες τις ζυμώσεις, πλην αυτών που διενεργήθηκαν στον βιοαντιδραστήρα, το υπόστρωμα γλυκερόλης αφομοιώθηκε πλήρως. Η αφομοίωση της γλυκερόλης

γινόταν σχετικά πιο γρήγορα από το στέλεχος ACA-YC 5032. Η προσθήκη ΥΑΕ στις ζυμώσεις βυθού έχει σαν αποτέλεσμα πιο γρήγορες κινητικές όσον αφορά την κατανάλωση του υποστρώματος.

- Η παραγωγή της βιομάζας έφθασε σε όλες τις ζυμώσεις σε ικανοποιητικά επίπεδα. Η προσθήκη ΥΑΕ σε όγκους τέτοιους ώστε στο μέσο της καλλιέργειας να υπάρχει συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων Pho ~3,5 g/L, επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή της βιομάζας. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στην παραγωγή της βιομάζας συγκριτικά με τις ζυμώσεις αναφοράς.
- Τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, δεν παρουσιάζουν σημαντική ελαιογόνο ικανότητα όταν καλλιέργούνται σε υπόστρωμα γλυκερόλης με περιοριστικό στοιχείο αύξησης το άζωτο. Παρόλα αυτά η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους κυμάνθηκε σε ποσοστά ~13-30% βάρος κατά βάρος ξηρής βιομάζας. Στην μελέτη αυτή καταδεικνύεται η θετική επίδραση της προσθήκης ΥΑΕ στην συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους.
- Και τα δύο στελέχη εμφανίζουν σχετική ικανότητα παραγωγής πολυολών αλλά οι μέγιστες τιμές τους παρατηρούνται στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032. Η παραγωγή της μαννιτόλης δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν με προσθήκη κατσίγαρου, εκτός από τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε συγκέντρωση φαινολικών 2 g/L, όπου και σημειώνεται πτώση στη μέγιστη τιμή της Man<sub>max</sub> σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα. Την ίδια τάση φαίνεται να παρουσιάζει και η παραγωγή της αραβιτόλης η οποία παράγεται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις. Αντιθέτως, η παραγωγή της ερυθριτόλης παρουσιάζει πτωτική τάση στις ζυμώσεις με προσθήκη κατσίγαρου. Στις ζυμώσεις με συγκέντρωση φαινολικών ~3,5 g/L παράγεται πολύ λιγότερη ερυθριτόλη πιθανότατα λόγω στροφής του μεταβολισμού του κυττάρου στην παραγωγή κιτρικού οξέος. Και σε αυτήν την περίπτωση εξαίρεση αποτελούν οι ζυμώσεις με συγκέντρωση φαινολικών 2 g/L όπου η ερυθριτόλη παρουσιάζει τις μεγαλύτερες μέγιστες τιμές από όλες τις ζυμώσεις.

- Η αύξηση των φαινολικών στο μέσο της καλλιέργειας, ευνοεί την συσσώρευση λιπιδίων με ολοένα μεγαλύτερο ποσοστό σε ελαϊκό οξύ.
- Στην παρούσα μελέτη η παραγωγή του κιτρικού οξέος στις ζυμώσεις βυθού αυξάνεται για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5032, σε συγκέντρώσεις φαινολικών  $Ph_0 \sim 2,0-3,5$  g/L, ενώ για το ACA-YC 5029 μειώνεται. Η προσθήκη ΥΑΕ στο υπόστρωμα σε υψηλότερους όγκους και άρα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών φαίνεται να ευνοεί την συσσώρευση κιτρικού οξέος συγκριτικά με τις ζυμώσεις με χαμηλότερη συγκέντρωση φαινολικών και άρα χαμηλότερους όγκους ΥΑΕ.
- Στον βιοαντιδράστηρα παρατηρείται η πιο μεγάλη παραγωγή κιτρικού οξέος σε τιμές πάνω από  $\sim 100$  g/L και σε αποδόσεις που φτάνουν έως  $Y_{Cit/Glcl}=0,89$  g/g. Συγκεκριμένα επιτεύχθη στην ημισυνεχή τροφοδοτούμενη ζύμωση μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος ( $Cit_{max}$ ) 105,7 g/L με αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης  $Y_{Cit/Glcl}=0,86$  g/g. Η εξωτερική τροφοδοσία με γλυκερόλη είχε ως αποτέλεσμα να στραφεί ο μεταβολισμός του κυτταρού προς την παραγωγή του κιτρικού οξέος εις βάρος της παραγωγής πολυολών και βιομάζας. Πρόκειται για σημαντικό εύρημα καθώς η παραγωγή του κιτρικού οξέος κρίνεται από τις πολύ υψηλές συγκριτικά με παρόμοιες μελέτες σε βιοαντιδραστήρες.
- Με τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν επιτεύχθη αποφαινόλωση σε ποσοστό  $\sim 10$  % (w/w) και αποχρωματισμός σε ποσοστό έως και  $\sim 30$  %. Μπορούν δηλαδή να χρησιμοποιηθούν για βιοαπορρύπανση περιβάλλοντων επιβαρυσμένων από ρύπανση.
- Η ακάθαρτη γλυκερόλη που προέρχεται από την παραγωγή βιοντήζελ μπορεί να θεωρηθεί μία πολύ καλή διαθέσιμη πηγή άνθρακα, μηδενικής ή ελάχιστης αξίας και η αξιοποίηση της έχει μεγάλο ενδιαφέρον για την βιοτεχνολογία.
- Η αξιοποίηση των ΥΑΕ σε βιοτεχνολογικές διεργασίες μειώνει τον αντίκτυπο που έχει στο περιβάλλον η ανεξέλεγκτη διάθεσή τους. Επιπλέον, τα ΥΑΕ θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν μερικώς ή και ολικώς το νερό ζύμωσης σε διάφορες διεργασίες και να αποτελέσουν μία καλή πηγή ενέργειας και φαινολικών καθιστώντας την όλη διεργασία οικονομικότερη.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Adhikari, S., Fernando, S.D., and Haryanto, A. (2009). Hydrogen production from glycerol: An update. *Energy Conversion and Management* 50, 2600–2604.

Aggelis, G., and Komaitis, M. (1999). Enhancement of single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing in the presence of *Teucrium polium* L. aqueous extract. *Biotechnology Letters* 21, 747–749.

Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V., and Papanikolaou, S. (2003). Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research* 37, 3897–3904.

Aissam, H., Penninckx, M.J., and Benlemlih, M. (2007). Reduction of phenolics content and COD in olive oil mill wastewaters by indigenous yeasts and fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1203–1208.

Amaral, P.F.F., Ferreira, T.F., Fontes, G.C., and Coelho, M.A.Z. (2009). Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food and Bioproducts Processing* 87, 179–186.

André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M., and Papanikolaou, S. (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products* 31, 407–416.

Arzumanov, T.E., Shishkanova, N.V., and Finogenova, T.V. (2000). Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 525–529.

Assas, N., Ayed, L., Marouani, L., and Hamdi, M. (2002). Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 38, 361–365.

Athenaki, M., Gardeli, C., Diamantopoulou, P., Tchakouteu, S.S., Sarris, D., Philippoussis, A., and Papanikolaou, S. (2018). Lipids from yeasts and fungi:

physiology, production and analytical considerations. *Journal of Applied Microbiology* 124, 336–367.

Bankar, A.V., Kumar, A.R., and Zinjarde, S.S. (2009). Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 847–865.

Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. (1990). Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.

Barnett, J.A. (2000). A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* 16, 755–771.

Belitz, H.D., Grosch, W., and Schieberle, P. (2009). *Food chemistry* (Springer Berlin Heidelberg).

Bellou, S., Makri, A., Triantaphyllidou, I.E., Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2014). Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiology (United Kingdom)* 160, 807–817.

BeMiller, J.N. (1996). Food Polysaccharides and Their Applications. *Trends in Food Science & Technology* 7, 207–208.

Beopoulos, A., Mrozova, Z., Thevenieau, F., Le Dall, M.T., Hapala, I., Papanikolaou, S., Chardot, T., and Nicaud, J.M. (2008). Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7779–7789.

Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarrea, J.L., Molina-Jouve, C., and Nicaud, J.M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research* 48, 375–387.

Berovic, M., and Legisa, M. (2007). Citric acid production. *Biotechnology Annual Review* 13, 303–343.

Bozbas, K. (2008). Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 12, 542–552.



- Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S.M., Montalcini, T., Pujia, A., and Russo, D. (2014). Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: Focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine* 12.
- Cabrera, F., López, R., Martínez-Bordiú, A., Dupuy de Lome, E., and Murillo, J.M. (1996). Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 38, 215–225.
- Carsanba, E., Papanikolaou, S., and Erten, H. (2018). Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Critical Reviews in Biotechnology* 38, 1230–1243.
- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti, P., Onjaro, G., Aggelis, G., and Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy* 36, 1097–1108.
- Chatzifragkou, A., Petrou, I., Gardeli, C., Komaitis, M., and Papanikolaou, S. (2011). Effect of *Origanum vulgare* L. essential oil on growth and lipid profile of *Yarrowia lipolytica* cultivated on glycerol-based media. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* 88, 1955–1964.
- Chatzifragkou, A., and Papanikolaou, S. (2012). Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95, 13–27.
- Chtourou, M., Ammar, E., Nasri, M., and Medhioub, K. (2004). Isolation of a yeast, *Trichosporon cutaneum*, able to use molecular weight phenolic compounds: Application to olive mill waste water treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79, 869–878.
- Claude, S. (1999). Research of new outlets for glycerol - recent developments in France. *Lipid - Fett* 101, 101–104.

Coelho, M.A.Z., Amaral, P.F.F., and Belo, I. (2010). *Yarrowia lipolytica* : an industrial workhorse. In *Current Research Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, A. Mendez-Vilas, ed. (Formatex 2010), pp. 930–944.

Crognale, S., D'Annibale, A., Federici, F., Fenice, M., Quaratino, D., and Petruccioli, M. (2006). Olive oil mill wastewater valorisation by fungi. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81, 1547–1555.

D'Annibale, A., Sermanni, G.G., Federici, F., and Petruccioli, M. (2006). Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology* 97, 1828–1833.

Da Silva, G.P., Mack, M., and Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 27, 30–39.

Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., and Momenbeik, F. (2009). Effect of Plant Oils upon Lipase and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009, 1–7.

De Felice, B., Pontecorvo, G., and Carfagna, M. (1997). Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnologica* 17, 231–239.

Demain, A.L. (1998). Microbial natural products: Alive and well in 1998. *Nature Biotechnology* 16, 3–4.

Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G., and Philippoussis, A. (2012). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 536–551.

Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Katsarou, E., Komaitis, M., Aggelis, G., and Philippoussis, A. (2012). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part II: Study of *Volvariella volvacea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 1890–1906.

Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G., and Philippoussis, A. (2014). Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37, 1385–1400.

Dourou, M., Kancelista, A., Juszczak, P., Sarris, D., Bellou, S., Triantaphyllidou, I.E., Rywinska, A., Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2016). Bioconversion of olive mill wastewater into high-added value products. *Journal of Cleaner Production* 139, 957–969.

Ergül, F.E., Sargin, S., Öngen, G., and Sukan, F.V. (2011). Dephenolization and decolorization of olive mill wastewater through sequential batch and co-culture applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 107–114.

Fakas, S. (2017). Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Engineering in Life Sciences* 17, 292–302.

Fan, X., Burton, R., and Zhou, Y. (2010). Glycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals - Mini Review~!2009-08-26~!2010-02-02~!2010-04-09~! The Open Fuels & Energy Science Journal 3, 17–22.

Fazenda, M.L., Seviour, R., McNeil, B., and Harvey, L.M. (2008). Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology* 63, 33–103.

Fickers, P., Benetti, P.H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S., and Nicaud, J.M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. In *FEMS Yeast Research*, (Elsevier), pp. 527–543.

Fiestas, J.A., De Ursinos, R., and Padilla, R.B. (1992). Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites International Journal of Fats and Oils* 43, 101–106.

Folch, J., Lees, M., and Stanley, G.H.S. (1956). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497–509.

Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E., Aggelis, G.G., and Lyberatos, G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 36, 4735–4744.

Galiotou-Panayotou, M., Kalantzi, O., and Aggelis, G. (1998). Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 73, 155–162.

García García, I., Jiménez Peña, P.R., Bonilla Venceslada, J.L., Martín Martín, A., Martín Santos, M.A., and Ramos Gómez, E. (2000). Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 35, 751–758.

Gern, R.M.M., Wisbeck, E., Rampinelli, J.R., Ninow, J.L., and Furlan, S.A. (2008). Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology* 99, 76–82.

Gupta, M., and Kumar, N. (2012). Scope and opportunities of using glycerol as an energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 4551–4556.

Hamdi, M., Garcia, J.L., and Ellouz, R. (1992). Integrated biological process for olive mill wastewater treatment. *Bioprocess Engineering* 8, 79–84.

Holzschu, D.L., Chandler, F.W., Ajello, L., and Ahearn, D.G. (1979). Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. *Medical Mycology* 17, 71–78.

Israilides, C.J., Vlyssides, A.G., Mourafeti, V.N., and Karvouni, G. (1997). Olive oil wastewater treatment with the use of an electrolysis system. *Bioresource Technology* 61, 163–170.

Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., and Nishio, N. (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100, 260–265.

Johnson, D.T., and Taconi, K.A. (2007). The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress* 26, 338–348.

Jones, M. and Fleming, S. (n.d.) (1998). *Organic chemistry*. W W Norton & Co Inc (Np), p. 139.

Kapellakis, I.E., Tsagarakis, K.P., Avramaki, C., and Angelakis, A.N. (2006). Olive mill wastewater management in river basins: A case study in Greece. *Agricultural Water Management* 82, 354–370.

Katre, G., Joshi, C., Khot, M., Zinjarde, S., and Ravikumar, A. (2012). Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. *AMB Express* 2, 1–23.

Knupp, G., Rucker, G., RamosCormenzana, A., Hoyos, S.G., Neugebauer, M., and Ossenkop, T. (1996). Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 38, 277–282.

Koganti, S., Kuo, T.M., Kurtzman, C.P., Smith, N., and Ju, L.K. (2011). Production of arabitol from glycerol: Strain screening and study of factors affecting production yield. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 257–267.

Koller, M., Bona, R., Braunegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., and Varila, P. (2005). Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules* 6, 561–565.

Kornaros, M., and Lyberatos, G. (2006). Biological treatment of wastewaters from a dye manufacturing company using a trickling filter. *Journal of Hazardous Materials* 136, 95–102.

Krawczyk, T. (1996). Biodiesel - Alternative Fuel Makes Inroads but Hurdles Remain. *Inform* 7, 801–829.

Kumdam, H., Murthy, S.N., and Gummadi, S.N. (2013). Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: Influence of process parameters. *AMB Express* 3, 1–12.

Lakhtar, H., Ismaili-Alaoui, M., Philippoussis, A., Perraud-Gaime, I., and Roussos, S. (2010). Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64, 167–172.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Baldi, D., Angrisani, R., Suzzi, G., Mastrocola, D., and Guerzoni, M.E. (2005). Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technology* 96, 317–322.

Lee, S.Y., Hong, S.H., Lee, S.H., and Park, S.J. (2004). Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis. In *Macromolecular Bioscience*, pp. 157–164.

Leoneti, A.B., Aragão-Leoneti, V., and de Oliveira, S.V.W.B. (2012). Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy* 45, 138–145.

Max, B., Salgado, J.M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A., and Domínguez, J.M. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 862–875.

McCoy, M. (2005). DRUG FIRMS REPORT A DECENT QUARTER. *Chemical & Engineering News* 83, 24–25.

McCoy, M. (2006). GLYCERIN SURPLUS. *Chemical & Engineering News* 84, 7.

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426–428.

Morgunov IG, Kamzolova SV, Perevoznikova OA, Shishkanova NV, Finogenova TV (2004). Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem* 39:1469–1474

Najafpour, G.D., Zinatizadeh, A.A.L., and Lee, L.K. (2006). Performance of a three-stage aerobic RBC reactor in food canning wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal* 30, 297–302.

Niaounakis, M., and Halvadakis, C.P. (2006). Characterization of Olive Processing Waste. In *Olive Processing Waste Management Literature Review and Patent Survey*, M. Niaounakis, and C.P. Halvadakis, eds. (Elsevier), pp. 23–64.

Nicaud, J.M. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 29, 409–418.

Pagliari, M., Ciriminna, R., Kimura, H., Rossi, M., and Della Pina, C. (2007). From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie - International Edition* 46, 4434–4440.

Pagliari, M., and Rossi, M. (2008). The Future of Glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material.

Papanikolaou, S. (2001). Enzyme-catalyzed synthesis of alkyl- $\beta$ -glucosides in a water-alcohol two-phase system. *Bioresource Technology* 77, 157–161.

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

Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2003). Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Current Microbiology* 46, 398–402.

Papanikolaou, S., Gortzi, O., Margeli, E., Chinou, I., Galiotou-Panayotou, M., and Lalas, S. (2008). Effect of Citrus essential oil addition upon growth and cellular lipids of *Yarrowia lipolytica* yeast. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 997–1006.

Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2009). Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology* 21, 83–87.

Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 639–654.

Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 1031–1051.

Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 1052–1073.

Papanikolaou, S., Kampsopoulou, E., Blanchard, F., Rondags, E., Gardeli, C., Koutinas, A.A., Chevalot, I., and Aggelis, G. (2017). Production of secondary metabolites through glycerol fermentation under carbon-excess conditions by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium toruloides*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 119.

Philippoussis, A. & Diamantopoulou, P. (2011). Agro-food industry wastes and agricultural residues conversion into high value products by mushroom cultivation. In the Book of Abstracts of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7), Arcachon, France, 4-7 October, pp. 344-356.

Processes, A. (2006). Olive Processing Waste Management - Literature Review and Patent Survey. *Waste Management Series* 5, 171–218.

Psomiadou, E., and Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 722–727.

Pyle, D., and Wen, Z. (2008). Production of Omega-3 fatty acid-rich microalgae from biodiesel derived crude glycerol: Effects of glycerol impurities on algal growth and DHA production. In American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2008, (Providence, RI), pp. 1767–1778.

Rahmat, N., Abdullah, A.Z., and Mohamed, A.R. (2010). Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 987–1000.



- Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids* pp 235-291.
- Ratledge, C., and Wynn, J.P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology* 51, 1–51.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86, 807–815.
- Rizzo, M., Ventrice, D., Varone, M.A., Sidari, R., and Caridi, A. (2006). HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42, 46–55.
- Rymowicz, W., Fatykhova, A.R., Kamzolova, S.V., Rywińska, A., and Morgunov, I.G. (2010). Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 971–979.
- Roostita, R., and Fleet, G.H. (1996). The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 28, 393–404.
- Roukas, T. (2000). Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25, 298–304.
- S'habou, R., Zairi, M., Kallel, A., Aydi, A., and Dhia, H.B. (2009). Assessing the effect of an olive mill wastewater evaporation pond in sousse, Tunisia. *Environmental Geology* 58, 679–686.
- Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A.A., Komaitis, M., and Papanikolaou, S. (2011). Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86, 1439–1448.

Sarris, D., Giannakis, M., Philippoussis, A., Komaitis, M., Koutinas, A.A., and Papanikolaou, S. (2013). Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 88, 958–969.

Sarris, D., Matsakas, L., Aggelis, G., Koutinas, A.A., and Papanikolaou, S. (2014). Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under non-aseptic conditions. *Industrial Crops and Products* 56, 83–93.

Sarris, D., Stoforos, N.G., Mallouchos, A., Kookos, I.K., Koutinas, A.A., Aggelis, G., and Papanikolaou, S. (2017). Production of added-value metabolites by *Yarrowia lipolytica* growing in olive mill wastewater-based media under aseptic and non-aseptic conditions. *Engineering in Life Sciences* 17, 695–709.

Sayadi, S., and Ellouz, R. (1995). Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1098–1103.

Scioli, C., and Vollaro, L. (1997). The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Research* 31, 2520–2524.

Seviour, R.J., Stasinopoulos, S.J., Auer, D.P.F., and Gibbs, P.A. (1992). Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology* 12, 279–298.

Slinkard, K., and Singleton, V.L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28, 49–55.

Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., and Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology and Biotechnology* 44, 141–149.

Stacey, M., and S. Barker. *Uglevody zhivvykh tkanei*. Moscow, 1965

Szabo, R. (1999). Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: Filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. *Folia Microbiologica* 44, 19–24.

Tang, Y.J., and Zhong, J.J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 20–28.

Tchakouteu, S.S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A.A., Aggelis, G., and Papanikolaou, S. (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: Strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of Applied Microbiology* 118, 911–927.

Rywińska, A., Rymowicz, W., and Marcinkiewicz, M. (2010). Valorization of raw glycerol for citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Electronic Journal of Biotechnology* 13

Tomaszewska, L., Rywińska, A., and Gładkowski, W. (2012). Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39, 1333–1343.

Tomaszewska, L., Rakicka, M., Rymowicz, W., and Rywińska, A. (2014). A comparative study on glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. *FEMS Yeast Research* 14, 966–976.

Tsagaraki, E., Lazarides, H.N., and Petrotos, K.B. (2007). Olive mill wastewater treatment. In *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, (Springer US), pp. 133–157.

Van der Walt, J.P., and von Arx, J.A. (1980). The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 46, 517–521.

Van Gerpen, J., Shanks, B., Pruszko, R., Clements, D., and Knothe, G. (2004). *Biodiesel Production Technology*.

Visioli, F., Bellomo, G., and Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247, 60–64.

Wickerham, L.J. (1953). The yeasts, a taxonomic study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 43, 495–496.

Wolfson, A., Litvak, G., Dlugy, C., Shotland, Y., and Tavor, D. (2009). Employing crude glycerol from biodiesel production as an alternative green reaction medium. *Industrial Crops and Products* 30, 78–81.

Wu, J., Ding, Z.Y., and Zhang, K.C. (2006). Improvement of exopolysaccharide production by macro-fungus *Auricularia auricula* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 743–749.

Yarrow, D. (1972). Four new combinations in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 38, 357–360.

Yazdani, S.S., and Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 213–219.

Yorulmaz, A., Poyrazoglu, E.S., Ozcan, M.M., and Tekin, A. (2012). Phenolic profiles of Turkish olives and olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114, 1083–1093.

Zenjari, B., and Nejmeddine, A. (2001). Impact of spreading olive mill wastewater on soil characteristics: Laboratory experiments. *Agronomie* 21, 749–755.

Zerva, A., Zervakis, G.I., Christakopoulos, P., and Topakas, E. (2017). Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *Journal of Environmental Management* 203, 791–798.

Zhang, G., Lin, Y., He, P., Li, L., Wang, Q., and Ma, Y. (2014). Characterization of the sugar alcohol-producing yeast *Pichia anomala*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41, 41–48.

Βολικάκη, Χ. (2008). Μέθοδοι επεξεργασίας υγρών και στερεών αποβλήτων ελαιοτριβείων, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, Ελλάδα.

Κυριακόπουλος, Χ. Η αποδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων μετά από εφαρμογή τους στο έδαφος. (2005). Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Μπαλατσούρας Γ.Δ. (1997): Το Ελαιόδενδρο. - Αθήνα, σελ. 409.