



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου**

**Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων**

**ΠΜΣ: ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΑ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

*«Αξιοποίηση αποβλήτων ζυθοποιίας για την ανάπτυξη βιοδιυλιστηρίου και την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας »*

Επιβλέπων Καθηγητής:

Κουτίνας Απόστολος

**Κακούρας Φ. Γεώργιος**

**ΑΘΗΝΑ 2018**



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων**

**ΠΜΣ: ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΑ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

*«Αξιοποίηση αποβλήτων ζυθοποιίας για την ανάπτυξη βιοδιυλιστηρίου και την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας »*

Επιβλέπων Καθηγητής:

Κουτίνας Απόστολος

**Κακούρας Φ. Γεώργιος**

**ΑΘΗΝΑ 2018**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

*«Αξιοποίηση αποβλήτων ζυθοποιίας για την ανάπτυξη βιοδιυλιστηρίου και την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας»*

### **Εξεταστική Επιτροπή:**

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής  
Παπανικολάου Σεραφείμ, Επίκουρος Καθηγητής  
Δροσινός Ελευθέριος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Επιβλέπων:

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής

**Κακούρας Γεώργιος**

**ΑΘΗΝΑ 2018**

## Περίληψη

Η μελέτη αποβλέπει στην δημιουργία βιοδιυλιστηρίου μέσω της αξιοποίησης αποβλήτων ζυθοποιίας που παράγονται καθημερινά σε μεγάλες ποσότητες και παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας με την χρήση μικροοργανισμού. Ειδικότερα, σκοπός της μελέτης είναι η παραγωγή μικροβιακού λίπους, αξιοποιώντας τα υπολείμματα βύνης μέσω ζύμωσης με τη χρήση του μικροοργανισμού *Lipomyces starkeyi*. Ακόμα, προσδιορίστηκε η σύσταση των αποβλήτων σε πρωτεΐνη, λιπίδια και αντιοξειδωτικά και ακολούθησε η εξαγωγή τους.

Αρχικά, έχοντας στόχο την δημιουργία ενός βιοδιυλιστηρίου, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση των συστατικών προστιθέμενης αξίας από το απόβλητο όπως τα αντιοξειδωτικά, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Για τη βέλτιστη εκχύλιση των αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκε υδατόλουτρο υπερήχων και διάλυμα EtOH-HCl. Όσον αφορά στην παραλαβή των πρωτεϊνών, αυτή έγινε με την κατακρήμνιση τους ρυθμίζοντας το pH στο ισοηλεκτρικό τους σημείο και τέλος η εκχύλιση λίπους έγινε με τη μέθοδο Soxhlet χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το εξάνιο.

Το υπολειπόμενο στερεό, αφού υδρολύθηκε χημικά και ενζυμικά, έδωσε ένα κλάσμα πλούσιο σε σάκχαρα, που αποτέλεσε το υπόστρωμα για τη μικροβιακή ζύμωση ώστε να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν. Απαραίτητη για την διεξαγωγή της ζύμωσης ήταν η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Lipomyces starkeyi* σε διάλυμα σακχάρων μέχρι τη λογαριθμική του φάση.

Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα με σύστημα fed-batch, ρυθμισμένος στις ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο υπόστρωμα. Η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν 64,37 g/L και κατά την διάρκεια της ζύμωσης γινόταν τροφοδοσία του μέσου με διάλυμα σακχάρων, όπου αυτό θεωρούταν απαραίτητο. Η ζύμωση διήρκησε 218 ώρες με τη μέγιστη παραγωγή λίπους να φτάνει τα 11,56 g/L. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του λίπους από τα κύτταρα της ζύμης με τη μέθοδο Folch, ακολούθησε μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων του λίπους και προσδιορισμός τους με τη μέθοδο αέριας χρωματογραφίας.

Λέξεις κλειδιά: απόβλητα ζυθοποιίας, υπολείμματα βύνης, BSG, λίπος, *Lipomyces starkeyi*

## **Abstract**

The study aims to create a biorefinery by exploiting the brewery waste that is produced daily in large quantities and the production of added value products with the use of a microorganism. More specifically, the purpose of the study is to produce microbial oil, utilizing brewer's spent grain by fermentation using the microorganism *Lipomyces starkeyi*. In addition, the waste composition of protein, lipid and antioxidant was determined, followed by their extraction.

Initially, with the aim of creating a biorefinery, extraction of added value ingredients from waste, such as antioxidants, proteins and lipids, took place. EtOH-HCl solution and an ultrasonic water bath were used to optimally extract the antioxidants. As far as the proteins are concerned, they were precipitated by adjusting the pH to their isoelectric point and finally oil extraction was performed using the Soxhlet method and hexane as the solvent.

The residual solid, after being chemically and enzymatically hydrolyzed, gave a sugar-rich fraction, which was used as the substrate for microbial fermentation to produce the desired product. The cultivation of *Lipomyces starkeyi* in sugar solution up to its log phase was necessary in order for the fermentation to be successful.

The fermentation was carried out in a bioreactor with a fed-batch system, adjusted to the ideal conditions for the growth of the micro-organism on the substrate. The initial concentration of the substrate was 64.37 g / L, and during the fermentation the medium was supplied with a sugar solution, where this was considered necessary. The fermentation lasted 218 hours with maximum oil production reaching 11.56 g / L. Finally, extraction of oil from the yeast cells was performed using the Folch method, followed by transesterification of the oil fatty acids and their determination using gas chromatographic method.

Keywords: brewery wastes, brewer's spent grain, BSG, oil, *Lipomyces starkeyi*

## Ευχαριστίες

Με την ευκαιρία της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας, στο πλαίσιο του Π.Μ.Σ. «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου», θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση της. Πρώτα απ' όλα στους καθηγητές μου, κ. Κουτίνα Απόστολο και κ. Παπανικολάου Σεραφείμ, που μου έδωσαν την ευκαιρία για την συμμετοχή στο πρόγραμμα, που με εμπιστεύθηκαν και μου ανέθεσαν στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας. Θέλω επίσης να τους ευχαριστήσω για τον πολύτιμο χρόνο που μου διέθεσαν, για τις παρατηρήσεις, τις συμβουλές και για το άριστο κλίμα που χαρακτήρισε τη μεταξύ μας συνεργασία.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Διδάκτορα Χρυσάνθη Πατεράκη για τις πολύτιμες υποδείξεις και τη στήριξη της σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος, καθώς και στην Διδάκτορα Παπαδάκη Κατερίνα για την πολύτιμη βοήθειά της. Επίσης, δεν θα παραλείψω να ευχαριστήσω τα μέλη των εργαστηρίων που στάθηκαν αρωγοί, στην προσπάθειά μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους γονείς μου, τον πατέρα μου και την μητέρα μου, όπου με τον κάθε τρόπο υποστήριξης τους, συνέβαλαν καθοριστικά στην προσήλωσή μου στους στόχους και στη διάθεσή μου να προχωρήσω ένα βήμα παραπάνω. Ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω σε όλους τους δικούς μου ανθρώπους και φίλους που στάθηκαν δίπλα μου παρέχοντας αμέριστη συμπαράσταση και ηθική στήριξη.

# Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
Ευχαριστίες.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Απόβλητα τροφίμων.....	10
1.2 Μπύρα.....	10
1.3 BSG.....	15
1.3.1 Συντήρηση και αποθήκευση του BSG.....	16
1.3.2 Χημική σύσταση BSG.....	17
1.3.3 Εφαρμογές του BSG.....	19
1.4 Μικροβιακό λίπος.....	20
1.5 <i>Lipomyces starkeyi</i> .....	25
1.5.1 Βιοσύνθεση λίπους.....	27
1.5.2 Ένζυμα που παίρνουν μέρος κατά την βιοσύνθεση λιπιδίων στις ελαιογόνους ζύμες.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	32
2.2 Πρώτη ύλη.....	32
2.3 Ανάλυση σύστασης BSG.....	32
2.4 Βιοδιυλιστήριο BSG.....	40
2.4.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από το BSG.....	40
2.4.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών.....	40
2.4.3 Εκχύλιση κυτταρίνης.....	41
2.4.4 Ισοζύγιο μάζας BSG.....	41
2.5 Ζύμωση.....	42
2.5.1 Προκαλλιέργεια.....	42
2.5.2 Παρασκευή υποστρώματος.....	42
2.5.3 Ζύμωση.....	43
2.5.4 Εκχύλιση λίπους.....	44
2.5.5 Μετεστεροποίηση λιπαρών οξέων.....	44
2.5.6 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων.....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
3.1 Αποτελέσματα σύστασης BSG.....	47
3.2 Ισοζύγια μάζας BSG.....	51
3.2.1 Εκχύλιση φαινολικών.....	51
3.2.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών.....	51
3.2.3 Υδρόλυση.....	51
3.3 Ζύμωση.....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	58

4.1 Πρώτες ύλες.....	58
4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη ζύμωση.....	63
4.3 Εκχύλιση λίπους.....	65
4.4 Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα.....	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

### Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1.1 Μέγεθος παραγωγή μύρας από κριθάρι ανά χώρα .....	11
Εικόνα 1.2 Δομή σπόρου του κριθαριού .....	12
Εικόνα 1.3 Κυλινδρικές δεξαμενές ζύμωσης .....	14
Εικόνα 1.4 Διαδικασία παραγωγής μύρας.....	15
Εικόνα 1.5 Υπόλειμμα βύνης (BSG).....	16
Εικόνα 1.6 BSG μετά από ξήρανση σε φούρνο .....	17
Εικόνα 1.7 Σάρωση σωματιδίων BSG με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο .....	19
Εικόνα 1.8 Φερουλικό και p-κουμαρικό οξύ .....	20
Εικόνα 1.9 Αντίδραση παραγωγής βιοντίζελ .....	21
Εικόνα 1.10 Καλλιέργεια του <i>Lipomyces starkeyi</i> .....	25
Εικόνα 1.11 Τα στάδια της γλυκόλυσης περιληπτικά .....	28
Εικόνα 1.12 Διάφορες τύχες του πυροσταφυλικού .....	28
Εικόνα 1.13 Μεταβολικό μονοπάτι του <i>Lipomyces starkeyi</i> . .....	29
Εικόνα 1.14 Συσσώρευση μικροβιακού λίπους από τη ζύμη <i>Lipomyces starkeyi</i> .....	30
Εικόνα 2.1 Συσκευή απόσταξης Kjeldahl .....	37
Εικόνα 2.2 Συσκευή υγρής καύσης .....	37
Εικόνα 2.3 Συσκευές εκχύλισης Soxhlet.....	39
Εικόνα 2.4 Αριστερά: Θάλαμος νηματικής ροής Δεξιά: Επωαστήρες ζύμωσης .....	42
Εικόνα 2.5 Αντίδραση μετεστεροποίησης.....	44

### Περιεχόμενα γραφημάτων

Γράφημα 1.1 Ρυθμός κατανάλωσης μύρας ανά ήπειρο για τα έτη 2004-2013 .....	11
Γράφημα 1.2 Το ποσοστό των πρώτων υλών για παραγωγή βιοντίζελ στις Η.Π.Α. για το 2015.....	22
Γράφημα 1.3 Παγκόσμια κατανάλωση βιοντίζελ για το 2017.....	22
Γράφημα 2.1 Πρότυπη καμπύλη $K_2HPO_4$ για τον προσδιορισμό ανόργανου φωσφόρου .....	33
Γράφημα 2.2 Πρότυπη καμπύλη γλυκίνης, για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινοξέων .....	34
Γράφημα 2.3 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για τον προσδιορισμό της σύστασης σε ολικά φαινολικά συστατικά.....	35
Γράφημα 3.1 Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών έναντι της αραίωσης σε διαλύτη αιθανόλη (γκρι), αιθανόλη-HCl (κίτρινο), ακετόνη (μπλε), ακετόνη-HCl (πορτοκαλί).....	49
Γράφημα 3.2 Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών έναντι της αραίωσης σε διαλύτη αιθανόλη (μπλε), αιθανόλη-HCl (πορτοκαλί), ακετόνη (γκρι), ακετόνη-HCl (κίτρινο).....	50
Γράφημα 3. 3 Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών έναντι της αραίωσης σε διαλύτη αιθανόλη (μπλε), αιθανόλη-HCl (πορτοκαλί), ακετόνη (γκρι), ακετόνη-HCl (κίτρινο).....	51
Γράφημα 3.4 Διάγραμμα διαδικασίας ισοζυγίου μάζας.....	53



<b>Γράφημα 3.5</b> Παραγωγή βιομάζας (πορτοκαλί), λίπους (πράσινο) και κατανάλωση σακχάρων (μπλε), έναντι του χρόνου .....	55
---	----

### Περιεχόμενα πινάκων

<b>Πίνακας 1.1</b> Χημική ανάλυση βύνης κριθαριού (OWADES,1992) .....	13
<b>Πίνακας 3.1</b> Αποτελέσματα σύστασης BSG.....	48
<b>Πίνακας 3.2</b> συγκέντρωση φαινολικών συστατικών στο BSG με χρήση επωαστήρα υπό ανάδευση... 48	48
<b>Πίνακας 3.3</b> συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε πολτοποιημένο BSG με χρήση επωαστήρα υπό ανάδευση. ....	49
<b>Πίνακας 3.4</b> συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε πολτοποιημένο BSG με χρήση υπερήχων.....	50
<b>Πίνακας 3.5</b> συγκεντρώσεις σακχάρων σε g/L και g/g ξηρού στο εκχύλισμα από την όξινη υδρόλυση .....	52
<b>Πίνακας 3.6</b> συγκεντρώσεις σακχάρων σε g/L και g/g ξηρού στο εκχύλισμα από την βασική υδρόλυση .....	52
<b>Πίνακας 3.7</b> Αναγράφεται το ξηρό βάρος και ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων, η συγκέντρωση, ο ρυθμός παραγωγής και η περιεκτικότητα του λίπους και η απόδοση παραγωγής βιομάζας και λίπους έναντι των σακχάρων σε κάθε χρονική στιγμή τροφοδοσίας του βιοαντιδραστήρα.....	54
<b>Πίνακας 3.8</b> Σύσταση σε λιπαρά οξέα .....	56
<b>Πίνακας 3.9</b> Σύσταση λιπαρών οξέων από διαφορετικά έλαια.....	57
<b>Πίνακας 4.1</b> Υποστρώματα που μπορεί να καταναλώσει ο <i>Lipomyces starkeyi</i> .....	60

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

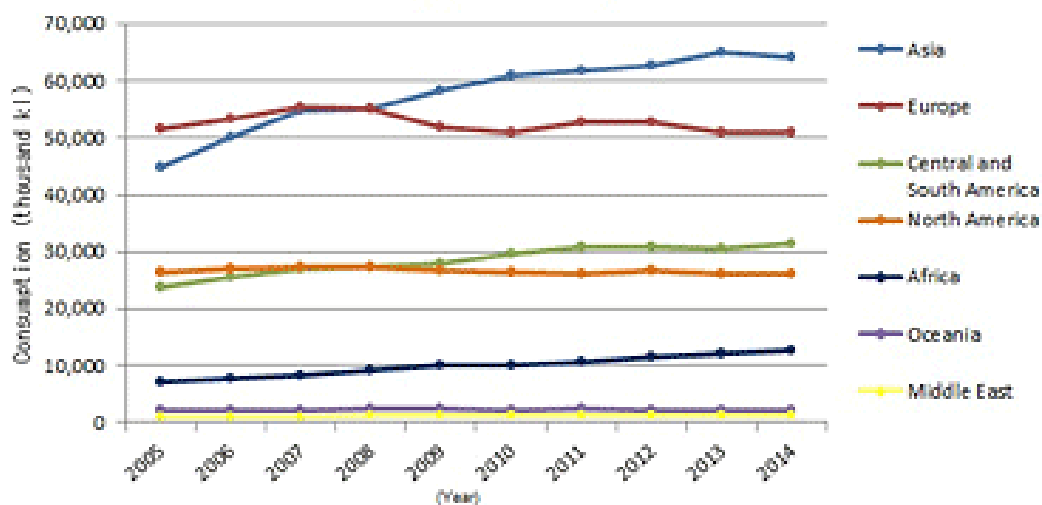
## **1.1 Απόβλητα τροφίμων**

Απόβλητα τροφίμων είναι τα τρόφιμα ή απορρίμματα της παραγωγής τροφίμων από οικίες και επιχειρήσεις όπως σημεία πώλησης φρούτων και λαχανικών, μαζική εστίαση και βιομηχανικές μονάδες. (United States Environmental Protection Agency, USEPA). Κάθε έτος 1,3 δις τόνοι τροφίμων χάνονται ή απορρίπτονται σε όλα τα στάδια της αλυσίδας τροφίμων (παραγωγή-επεξεργασία-κατανάλωση). Τα απόβλητα τροφίμων χωρίζονται σε φυτικά και σε ζωικά απόβλητα. Το σύνολο των αποβλήτων αγροτοβιομηχανικής προέλευσης χαρακτηρίζονται ως βιομάζα και αποτελούν πρώτη ύλη για παραγωγή προϊόντων είτε απευθείας, είτε μετά από επεξεργασία.

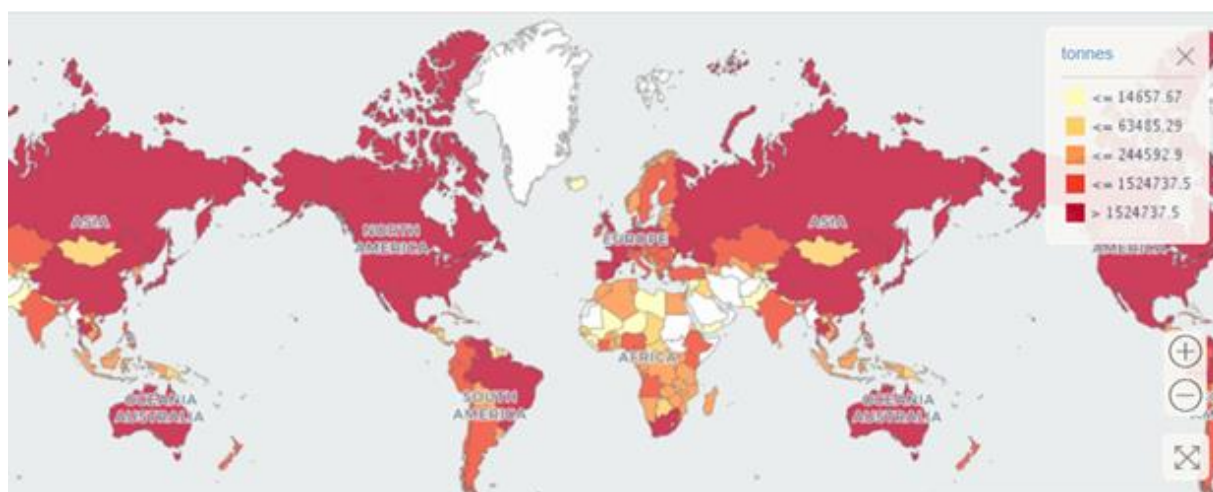
## **1.2 Μύρα**

Η μύρα θεωρείται πως είναι μέρος της διατροφής του ανθρώπου από την αρχαιότητα, αφού υπάρχουν στοιχεία ότι παραγόταν στην περιοχή της σημερινής Τουρκίας μεταξύ του 8500 και 5500 π.Χ. (Dietrich et al., 2012), ενώ είναι πιθανό, χωρίς να έχει αποδειχτεί, η εμφάνιση της να πηγαίνει ακόμα πίσω, τότε που τα δημητριακά καλλιεργήθηκαν για πρώτη φορά, το 10000 π.Χ (Mauk 2013). Το σίγουρο είναι, πως σε αρχαίους πολιτισμούς όπως οι Αιγύπτιοι, οι λαοί της Μεσοποταμίας, οι Ιρακινοί και οι Σουμέριοι, η μύρα συνέβαλε στη διαμόρφωση του πολιτισμού τους (Choi 2010). Στην Ευρώπη εξαπλώθηκε από γερμανικές και κέλτικες φυλές το 3000 π.Χ. και η παραγωγή της γινόταν σε εγχώρια κλίμακα, ενώ ήταν αρκετά διαφορετική από τη μύρα που γνωρίζουμε σήμερα. Πέρα από τη βασική πηγή αμύλου, οι πρώτες ευρωπαϊκές μύρες μπορεί να περιείχαν φρούτα, μέλι, μπαχαρικά ή βότανα. Η προσθήκη λυκίσκου έγινε για πρώτη φορά κοντά στο 822, ενώ το 1516 εγκρίθηκε ίσως ο πρώτος κανονισμός για την ποιότητα τροφίμων, που ισχύει μέχρι και σήμερα, σύμφωνα με τον οποίο τα μόνα επιτρεπόμενα συστατικά της μύρας είναι το νερό, ο λυκίσκος και η βύνη κριθαριού. Σήμερα, η μύρα αποτελεί το πιο διαδεδομένο αλκοολούχο ποτό παγκοσμίως και εμφανίζει την τρίτη πιο ευρεία κατανάλωση μετά το νερό και το τσάι. Η βιομηχανία ζυθοποιίας αποτελεί μια παγκόσμια επιχείρηση, που αποτελείται από πολλές κυρίαρχες πολυεθνικές εταιρείες και από χιλιάδες μικρότερους παραγωγούς. Η παραγωγή της το 2013 άγγιξε τα 197 δις λίτρα παγκοσμίως (Steiner et al., 2015) με τις πρώτες χώρες σε

παραγωγή για το 2016 να είναι η Κίνα (46 δις λίτρα), οι Η.Π.Α. (22,135 δις λίτρα) και η Βραζιλία (13,335 δις λίτρα).

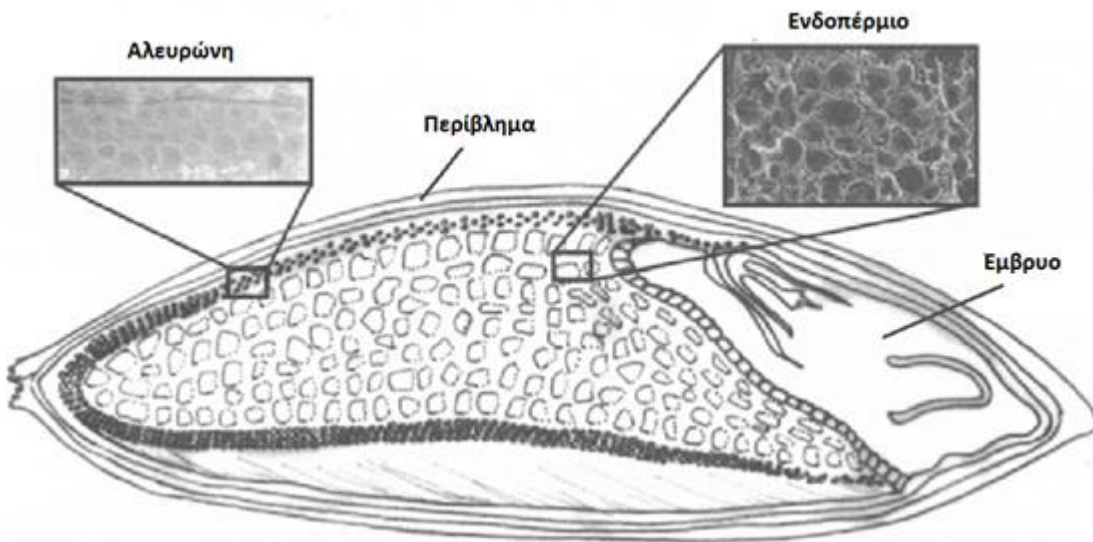


**Γράφημα 1.1** Ρυθμός κατανάλωσης μύρας ανά ήπειρο για τα έτη 2004-2013 (Kirinholdings)



**Εικόνα 1.1** Μέγεθος παραγωγής μύρας από κριθάρι ανά χώρα (FAOSTAT, 2018)

Το κριθάρι είναι το πιο σημαντικό δημητριακό μετά το σιτάρι, το καλαμπόκι και το ρύζι και χρησιμοποιείται κυρίως ως ζωοτροφή ή πρώτη ύλη για την παραγωγή μύρας. Είναι πλούσιο σε άμυλο και πρωτεΐνες και αποτελείται από τρία μέρη: το έμβρυο, το ενδοσπέρμιο (που περιλαμβάνει την αλευρώνη και το αμυλούχο ενδοσπέρμιο) και το περίβλημα (Εικόνα 1.2).



**Εικόνα 1.2** Δομή σπόρου του κριθαριού (Fox, 2009).

Κατά την προετοιμασία της παραγωγής μύρας, το κριθάρι καθαρίζεται και διαχωρίζεται ανάλογα με το μέγεθος, με τους μικρότερους κόκκους σε μέγεθος να βυνοποιούνται ξεχωριστά. Μετά από 4-6 εβδομάδες αδράνειας, βυνοποιείται σε μια διαδικασία ελεγχόμενης βλάστησης που αποτελείται από 3 στάδια: τη διαβροχή, τη βλάστηση και την ξήρανση. Κατά τη διαβροχή, καθαροί κόκκοι κριθαριού τοποθετούνται σε δεξαμενές με νερό σε θερμοκρασία 5-8 °C για 2 μέρες. Το νερό εισέρχεται στο έμβρυο και το ποσοστό υγρασίας των κόκκων αγγίζει το 42-48%. Σε αυτό το στάδιο το νερό ανανεώνεται κάθε 6-8 ώρες. Η ενυδάτωση κατά τη διαβροχή ξεκινάει τη βλάστηση και ενεργοποιεί το μεταβολισμό της αλευρώνης. Μετά τη διαβροχή το κριθάρι μεταφέρεται σε δοχείο βλάστησης, όπου περιστρέφεται με περιστρεφόμενο κοχλία, ενώ έρχεται σε επαφή με υγρό αέρα που διαπερνά τους κόκκους και κρατάει τη θερμοκρασία στους 15-21 °C. Αυτό το στάδιο διαρκεί 6 ή 7 ημέρες και προάγει τη σύνθεση και δράση των ενζύμων στην αλευρώνη και στο αμυλούχο ενδοσπέρμιο, συμπεριλαμβανομένων των αμυλασών, των πρωτεασών, των β-γλυκανών κ.α. Τα ένζυμα αυτά τροποποιούν τη δομή του αμυλούχου ενδοσπερμίου.

Στη συνέχεια, η βύνη ξηραίνεται στους 40-60 °C σε τελική υγρασία 4-5%, ώστε να αποφευχθεί η μικροβιακή μόλυνση και να ενεργοποιηθούν τα αρώματα των συστατικών. Μετά από αυτό το στάδιο, η βύνη αποθηκεύεται για 3 με 4 εβδομάδες για να έρθει σε ισορροπία και ομοιογένεια. Στη ζυθοποιία, η βύνη αλέθεται, αναμιγνύεται με νερό, ενώ θερμοκρασία αυξάνει σταδιακά, από τους 37 στους 78 °C, με σκοπό την ενζυματική υδρόλυση των συστατικών της βύνης, κυρίως του αμύλου, αλλά και των πρωτεϊνών, των β-γλυκανών και των αραβινοξυλάνων, και τη διαλυτοποίηση των προϊόντων διάσπασής τους. Το άμυλο μετατρέπεται σε ζυμώσιμα σάκχαρα, κυρίως μαλτόζη και μαλτοτριόζη, αλλά και μη

ζυμώσιμα, όπως δεξτρίνες, ενώ οι πρωτεΐνες αποικοδομούνται σε πολυπεπτίδια και αμινοξέα. Σε αυτό το στάδιο της σακχαροποίησης παράγεται ένα υγρο εκχύλισμα, γνωστό ως γλεύκος. Το αδιάλυτο μέρος της βύνης απλώνεται και το γλεύκος διηθείται δια μέσου του. Το ζυθογλεύκος χρησιμοποιείται ως το μέσο ζύμωσης για την παραγωγή μύρας, ενώ το στερεό υπόλειμμα βύνης, ή αλλιώς brewer's spent grain (BSG), συλλέγεται ως απόβλητο. Σύμφωνα με τον Townsley (1979), η διαδικασία ζυθοποίησης είναι επιλεκτική, αφού αφαιρεί μόνο τα συστατικά από τη βύνη που είναι απαραίτητα για τη ζύμωση, αφήνοντας τις αδιάλυτες πρωτεΐνες, τα υπολείμματα κυτταρικών τοιχωμάτων και τα επικαλύμματα των σπόρων στο BSG (Mussatto et al., 2006).

**Πίνακας 1.1** Χημική ανάλυση βύνης κριθαριού (Owades,1992)

Υγρασία	4%
Άμυλο και δεξτρίνες	52,5%
Μονοσακχαρίτες	9,5%
Πρωτεΐνες	13%
Διαλυτές πρωτεΐνες	5,4%
Κυτταρίνη	6%
Άλλες ίνες	10%
Λιπίδια	2,5%
Μέταλλα	2,5%

Το επόμενο στάδιο είναι ο βρασμός του ζυθογλεύκους που διαρκεί για 45-90 λεπτά και μπορεί να γίνει με 2 τρόπους. Είτε με άμεση θέρμανση με φλόγα στη βάση του δοχείου βρασμού, είτε με διοχέτευση ατμού με καλλάνδρια εσωτερικά ή εξωτερικά. Εδώ προστίθεται και ο λυκίσκος που δίνει τη γεύση και το άρωμα. Οι λόγοι για τους οποίους γίνεται ο βρασμός είναι η αποστείρωση του γλεύκους από ανεπιθύμητα βακτήρια, η παύση κάθε ενζυμικής δραστηριότητας, η ενεργοποίηση των αρωμάτων του λυκίσκου, η καθίζηση των πρωτεϊνών και η συμπύκνωση του γλεύκους. Στο τέλος του βρασμού το ζυθογλεύκος φιλτράρεται για να απομακρυνθούν στερεά υπολείμματα λυκίσκου. Το καθαρό ζυθογλεύκος οδηγείται σε εναλλάκτες θερμότητας με σκοπό τη ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 20-26 °C, ιδανική για ζύμωση.

Η ζύμωση παίρνει μέρος σε κυλινδρικές δεξαμενές και διαρκεί 5-9 ημέρες. Στο γλεύκος προστίθεται η ζύμη και αρχίζει να καταναλώνει γρήγορα οξυγόνο, και θρεπτικά συστατικά, όπως νάτριο φωσφόρο, μαγνήσιο και ψευδάργυρο, ενώ ο πλυθησμός της

πολλαπλασιάζεται περίπου 7 φορές. Όταν καταναλώσει όλο το οξυγόνο, ο πολλαπλασιασμός τελειώνει και οι ζύμες αρχίζουν να αναπτύσσονται σε αναερόβιο περιβάλλον παράγοντας αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο συλλέγεται ή απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα. Η θερμοκρασία της ζύμωσης εξαρτάται από το είδος της ζύμωσης που λαμβάνει χώρα. Οι ζύμες της ζυθοποίησης ταξινομούνται σε αφροζύμες και βυθοζύμες γιατί συλλέγονται είτε από την κορυφή, είτε από το κάτω μέρος του γλεύκους για να ξαναχρησιμοποιηθούν στην επόμενη παρασκευή. Βέβαια, πλέον ο διαχωρισμός αυτός δεν θεωρείται ορθός, διότι ανακαλύφθηκε πως οι 2 τρόποι συλλογής περιελάμβαναν 2 διαφορετικά είδη ζυμομυκήτων με 2 ξεχωριστές ευνοϊκές θερμοκρασίες. Τη θέση της αφροζύμης πήρε ο *Saccharomyces cerevisiae* που δρα σε θερμότερες θερμοκρασίες στους 15-20 °C και τη θέση της βυθοζύμης ο *Saccharomyces pastorianus* που δρα σε θερμοκρασίες 4-9 °C. Η μύρα που προκύπτει υπό τις συνθήκες της πρώτης περίπτωσης συναντάται στο εμπόριο με τον όρο ale, ενώ στη δεύτερη περίπτωση με τον όρο lager (Hansen, 1896).

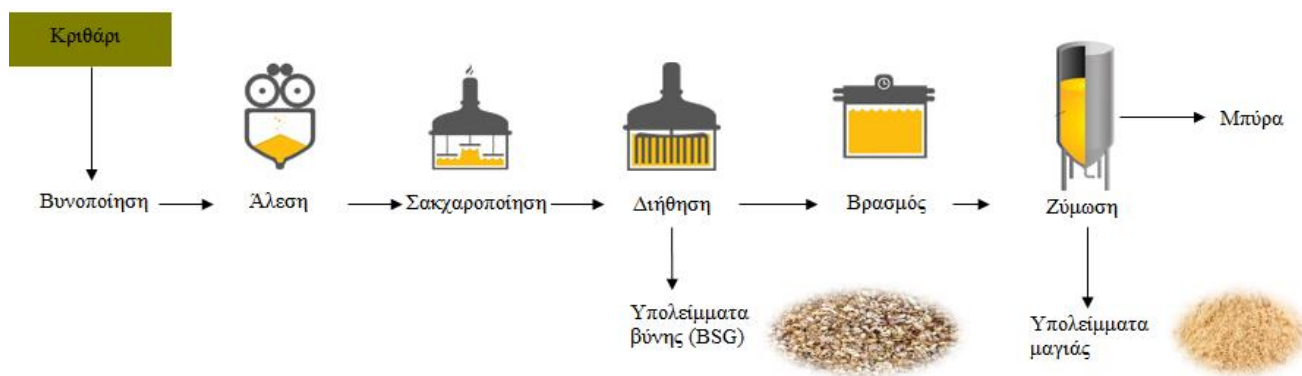


**Εικόνα 1.3** Κυλινδρικές δεξαμενές ζύμωσης

Μετά τη ζύμωση, οι ζύμες απομακρύνονται με διήθηση και το διήθημα αποθηκεύεται υπό ψύξη μέχρι να ωριμάσει, μια διαδικασία που μπορεί να διαρκέσει από 2-4 εβδομάδες, αρκετούς μήνες, ή χρόνια. Συνήθως η μύρα μεταφέρεται σε άλλη δεξαμενή, ώστε να μην εκτίθεται σε πιθανές νεκρές ζύμες που έχουν καθιζάνει από την ζύμωση, προφυλάσσοντας την από τυχόν ανεπιθύμητα αρώματα και επικίνδυνες ουσίες. Δεύτερη ζύμωση μπορεί να

πραγματοποιηθεί κατά την ωρίμανση από ζύμες που έχουν απομείνει δίνοντας ένα λιγότερο θολό προϊόν (Priest et al., 2006).

Στις περισσότερες μύρες ακολουθεί φιλτράρισμα. Το φιλτράρισμα της μύρας σταθεροποιεί τη γεύση και της προσδίδει λάμψη. Απομακρύνουν μεγάλο μέρος της ζύμης και στερεά υπολείμματα όπως λυκίσκο ή βύνη που μπορεί να έχουν απομείνει. Ανάλογα με τη θολότητα που επιθυμείται, διαβαθμίζονται και τα φίλτρα, ενώ υπάρχει και η αποστειρωμένη διήθηση που αφαιρεί όλους τους μικροοργανισμούς. Μετά το φιλτράρισμα, αν χρειάζεται, γίνεται και προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα και η μύρα εμφιαλώνεται.



Εικόνα 1.4 Διαδικασία παραγωγής μύρας

### 1.3 BSG

Στις μέρες μας ασκείται μεγάλη κοινωνική και πολιτική πίεση να μειωθούν οι ρύποι από βιομηχανικές δραστηριότητες. Σχεδόν όλες οι ανεπτυγμένες και υπο ανάπτυξη χώρες προσπαθούν να προσαρμοστούν σε αυτό το πλαίσιο, διαμορφώνοντας έτσι τις διεργασίες τους στην κατεύθυνση της ανακύκλωσης των αποβλήτων τους. Ως αποτέλεσμα, οι περισσότερες μεγάλες βιομηχανίες θεωρούν τα απόβλητα τους ως πρώτη ύλη για άλλες διεργασίες. Οι ζυθοποιίες είναι βιομηχανίες που παράγουν μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων και αποβλήτων, με επικρατέστερα τα υπολείμματα βύνης, λυκίσκου και μαγιάς. Τα περισσότερα από αυτά έχοντας αγροτική προέλευση μπορούν εύκολα να ξαναχρησιμοποιηθούν.

Το κύριο απόβλητο κατά την παραγωγή μύρας είναι τα υπολείμματα βύνης ή αλλιώς brewer's spent grain (BSG) και αποτελεί το 85% των συνολικών αποβλήτων κατά τη διαδικασία, πέρα από τα υπολείμματα λυκίσκου και ζύμης. Παράγονται κατά προσέγγιση 20



kg BSG ανά 100 L μύρας (Steiner, 2015), ενώ σύμφωνα με τον FAO περίπου 168 εκατομμύρια τόνοι BSG παράχθηκαν παγκοσμίως το 2009.



Εικόνα 1.5 Υπόλειμμα βίνης (BSG) (Longmanbrewery)

### 1.3.1 Συντήρηση και αποθήκευση του BSG

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του BSG σε υγρασία, διάφοροι μέθοδοι έχουν προταθεί για την παράταση του χρόνου ζωής του όταν βρίσκεται αποθηκευμένο, με πιο αποτελεσματική την ξήρανση του από την ίδια την ζυθοποιία. Ένα από τα πλεονεκτήματα της ξήρανσης είναι πως μειώνει τον όγκο του BSG, μειώνοντας έτσι και το κόστος μεταφοράς του. Ωστόσο, πολλές ζυθοποιίες δεν μπορούν πλέον να αντέξουν οικονομικά αυτή την πρακτική, λόγω της αυξανόμενης ανυσηχίας για το υψηλό ενεργειακό κόστος. Έτσι, ακολουθούν μια τεχνική δύο σταδίων, όπου αρχικά η περιεκτικότητα σε νερό μειώνεται κατά 60 % ασκόντας πίεση στο απόβλητο και ακολουθεί ξήρανση για να εξασφαλιστεί ότι η υγρασία είναι κάτω από 10 %. Ωστόσο, η παραδοσιακή διαδικασία ξήρανσης βασίζεται στη χρήση ξηραντήρων περιστρεφόμενου τύμπανου, η οποία είναι αρκετά ενεργοβόρα. Στην εργασία των Bartolome' et al. (2002) μελετήθηκαν τρεις τρόποι συντήρησης του BSG χρησιμοποιώντας τη λυοφιλίωση, την ξήρανση σε φούρνο και την ψύξη. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι δύο πρώτες μέθοδοι μειώνουν τον όγκο του BSG χωρίς να μεταβάλλει τη σύνθεσή του, ενώ η τρίτη θεωρήθηκε ακατάλληλη καθώς επηρέαζε την σύσταση κάποιων σακχάρων, όπως της αραβινόζης. Από την άλλη η λυοφιλίωση ήταν οικονομικά ασύμφορη σε μεγάλη κλίμακα, καθιστώντας έτσι την ξήρανση σε φούρνο την προτεινόμενη μέθοδο.





**Εικόνα 1.6** BSG μετά από ξήρανση σε φούρνο

Η ξήρανση λεπτού στρώματος με χρήση υπέρθερμου ατμού ως εναλλακτική μέθοδος προτάθηκε από τους Tang et al. (2005). Η κυκλοφορία του ατμού έγινε σε σύστημα κλειστού βρόχου μειώνοντας την κατανάλωση ενέργειας. Στα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου, οι υδρατμοί που προκύπτουν από την εξάτμιση της υγρασίας στο BSG μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλες διεργασίες, εξαλείφεται ο κίνδυνος πυρκαγιάς και μειώνεται η επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Τέλος, μια ακόμη μέθοδος ξήρανσης, είναι η διήθηση με μεμβράνη υπό πίεση, στην οποία το BSG αναμιγνύεται με νερό και διηθείται υπό πίεση 3 με 5 bar, ξεπλένεται με θερμό νερό (65°C), διηθείται με μεμβράνη και ξηραίνεται υπό κενό ώστε η υγρασία να φτάσει το 20 με 30%. Παρ'όλα αυτά, χημικά συντηρητικά όπως το γαλακτικό, το φορμικό, το οξικό και το μυρμηκικό οξύ μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για τη διατήρηση της ποιότητας και της διατροφικής αξίας του BSG.

### **1.3.2 Χημική σύσταση BSG**

Το BSG προκύπτει μετά το στάδιο της σακχαροποίησης και διήθησης στην παραγωγή μύρας. Ανάλογα με το επίπεδο της άλεσης του κριθαριού, μπορεί να παραμείνει λιγότερο ή

περισσότερο αμυλούχο ενδοσπέρμιο και κυτταρικά τοιχώματα της αλευρώνης. Η σύσταση σε άμυλο είναι ελάχιστη και υπάρχει περίπτωση να βρίσκεται μικρή ποσότητα λυκίσκου, ανάλογα με την διαδικασία παραγωγής μύρας που ακολουθείται.

Κυρίως, αποτελείται από τους φλοιούς, το περικάρπιο και μέρη του ενδοσπερμίου των κόκκων, τα οποία είναι πλούσια σε κυτταρίνη, μη κυτταρινούχους πολυσακχαρίτες και λιγνίνη, ενώ μπορεί να περιέχει κάποια ποσότητα πρωτεΐνης και λιπιδίων. Επιπλέον, ο φλοιός περιέχει σημαντική ποσότητα διοξειδίου του πυριτίου και αρκετά πολυφαινολικά συστατικά του κριθαριού. Σύμφωνα με τον Kunze (1996), το 25% των αλάτων που υπάρχουν στο κριθάρι είναι πυριτικά.

Η χημική σύσταση του BSG διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία κριθαριού, την εποχή θερισμού και τις συνθήκες πολτοποίησης και βυνοποίησης. Σε γενικές γραμμές, θεωρείται ένα λιγνοκυτταρινούχο υλικό, με την ημικυτταρίνη να βρίσκεται σε μορφή αραβινοξυλάνων (20-40% w/w) και την κυτταρίνη σε μορφή γλυκάνης, πλούσιο σε πρωτεΐνες και ίνες που αποτελούν το 20 και το 70% της σύστασης του αντίστοιχα. Η υψηλή συγκέντρωση των πρωτεϊνών και των ινών οφείλεται στο γεγονός πως το μεγαλύτερο μέρος το αμύλου έχει απομακρυνθεί. Οι πρωτεΐνες είναι κυρίως χορδεΐνες, γλοβουλίνες, αλβουμίνες και γλουτελίνες. Ακόμα, στη σύσταση του BSG εντοπίζονται βιταμίνες και μέταλλα, όπως ασβέστιο, κοβάλτιο, χαλκός, σίδηρος, μαγνήσιο, μαγγάνιο, φωσφόρος, κάλιο, σελήνιο, νάτριο και θείο, όλα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 0,5% (Huige, 1994, Pomeranz και Dikeman, 1976). Οι βιταμίνες που περιλαμβάνονται είναι η βιοτίνη (0,1 ppm), η χολίνη (1800 ppm), φολικό οξύ (0,2 ppm), νιασίνη (44 ppm), παντοθενικό οξύ (8,5 ppm), ριβοφλαβίνη (1,5 ppm), θειαμίνη (0,7 ppm) και πυριδοξίνη (0,7 ppm). Τα αμινοξέα που περιλαμβάνουν οι πρωτεΐνες είναι λευκίνη, βαλίνη, αλανίνη, σερίνη, γλυκίνη, γλουταμινικό οξύ και ασπαραγινικό οξύ στο μεγαλύτερο μέρος και τυροσίνη, προλίνη, θρεονίνη, αργινίνη και λυσίνη σε μικρότερες ποσότητες. Παρόν μπορεί να είναι επίσης η κυστίνη, η ιστιδίνη, η ισολευκίνη, η μεθειονίνη, η φαινυλαλανίνη και η τρυπτοφάνη (Huige, 1994, Mariani, 1953).

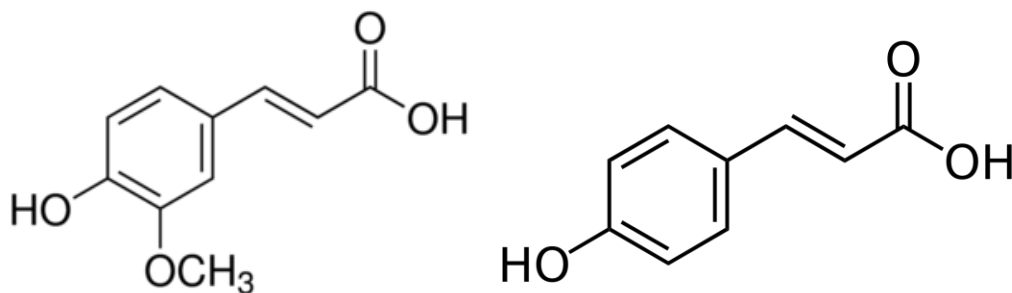


**Εικόνα 1.7** Σάρωση σωματιδίων BSG με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Mussatto,2006).

### 1.3.3 Εφαρμογές του BSG

Η εμπορική αξία του BSG είναι πολύ χαμηλή και χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για ζωοτροφές, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας του σε πρωτεΐνη και υδατοδιαλυτές βιταμίνες. Είναι αναγκαίο η χρήση του BSG να γίνει σε κοντινή απόσταση από τη ζυθοποιία, αφού περιέχει μεγάλη ποσότητα νερού και η μεταφορά του μπορεί να είναι δαπανηρή. Γι'αυτό το λόγο μια κοινή πρακτική είναι η απόρριψη του σε χωματερή, η οποία μπορεί να επιφέρει περιβαντολλογικές επιπτώσεις. Ήταν αναγκαία λοιπόν, η εύρεση εναλλακτικών τρόπων εκμεταλλευσης του. (Xiros, 2012)

Εκτός από ζωοτροφή, το BSG μπορεί να βρει εφαρμογή στην ανθρώπινη διατροφή, αφού πρώτα αλεστεί και βρίσκεται σε μορφή κόκκων. Με αυτόν τον τρόπο έχει επιτυχώς ενσωματωθεί σε προϊόντα αρτοποιίας. Η πλούσια σύστασή του σε φαινολικά, το καθιστά ένα ενδιαφέρον προϊόν για τη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων αλλά και καλλυντικών. Για παράδειγμα, το φερουλικό οξύ, που περιέχει, εμφανίζει πολλές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιθρομβωτικές και αντικαρκινικές. Προστατεύει από τη στεφανιαία νόσο, μειώνει τη χοληστερόλη στον ορό και στο ήπαρ (Ou and Kwok, 2004). Το p-κουμαρικό οξύ παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των χημειοπροστατευτικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του (Torres y Torres and Rosazza, 2001). Αυτά τα 2 δύο οξέα αποτελούν την πλειοψηφία των φαινολικών στο BSG δημιουργώντας νέες δυνατότητες για χρήση του αποβλήτου ζυθοποιίας.



Εικόνα 1.8 Φερουλικό και p-κουμαρικό οξύ

Ακόμα, το BSG έχει χρησιμοποιηθεί για παραγωγή κάρβουνων, τα οποία περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις μεταλλικών στοιχείων όπως ασβέστιο, μαγνήσιο και φωσφόρο και παρουσίασαν υψηλή θερμοδική αξία (27 MJ/kg). Η χαμηλή περιεκτικότητα του BSG σε τέφρα, καθώς και η υψηλή συγκέντρωση του σε κυτταρίνη, μη κυτταρινούχους πολυσακχαρίτες και λιγνίνη το καθιστά κατάλληλο για χρήση στην παραγωγή τούβλων βελτιώνοντας τα πορώδη και ξηρά χαρακτηριστικά τους. Άλλες περιπτώσεις που το BSG μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι στην παραγωγή χαρτιού και ως προσροφητικό σε διάφορους τύπους ενώσεων. Τέλος, το BSG είναι κατάλληλο για υπόστρωμα υψηλής βιοτεχνολογικής αξίας, αφού είναι πλούσιο σε πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και μέταλλα. Έτσι, βρίσκει αρκετές εφαρμογές, όπως την καλλιέργεια σε αυτό μικροοργανισμών, παραγωγή ενζύμων και προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

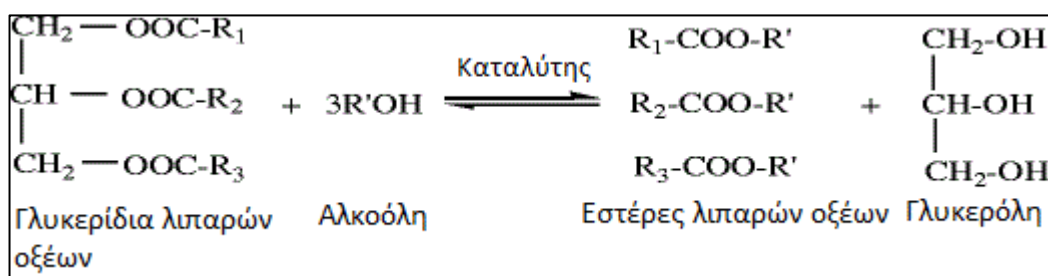
#### 1.4 Μικροβιακό λίπος

Το μικροβιακό λίπος είναι γνωστό από το 1980 ως υποκατάστατο του βουτύρου κακάο. Ακόμα, οι ερευνητές εστίασαν στην παραγωγή άλλων ωφέλιμων για τον άνθρωπο λιπαρών οξέων όπως το γ-λινελαϊκό οξύ (GLA), το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA), το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA) και το αραχιδονικό οξύ (ARA).

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η παραγωγή μικροβιακού λίπους, είτε ως λίπος υψηλής αξίας, είτε ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ. Την θέση των ακριβότερων υποστρωμάτων, που αποτελούσαν περιοριστικούς παράγοντες για την παραγωγή μικροβιακού λίπους, πήραν πρώτες ύλες χαμηλού κόστους, όπως η γλυκερόλη, έλαια, λίπη και λύματα, ενώ τελευταία ως ιδανικό υπόστρωμα θεωρείται η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα όπως άχυρο ρυζιού και σίτου ή διάφορα απόβλητα που προκύπτουν σε όλη την παραγωγική αλυσίδα

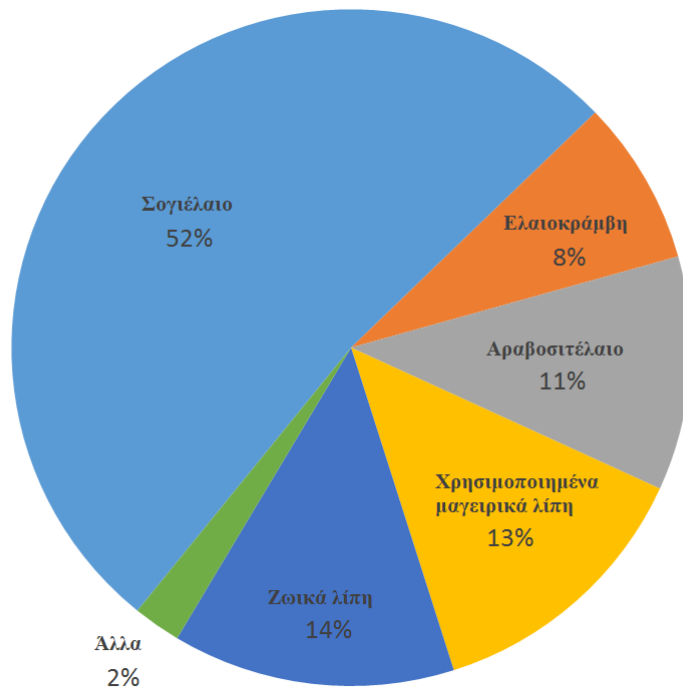
τροφίμων. Τα προηγούμενα υποστρώματα, εφαρμόζοντας μια απλή υδρόλυση, μπορούν να μετατραπούν σε υδρολύματα πλούσια σε σάκχαρα κατάλληλα για ζύμωση και παραγωγή μικροβιακού λίπους (Huang, 2013). Η ζύμωση γίνεται υπό αερόβιες συνθήκες και οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για παραγωγή μικροβιακού λίπους μπορεί να είναι ζύμες, βακτήρια ή μύκητες όπως οι *Rhodococcus spp.*, *Mortierella spp.*, *Cryptococcus albidus*, *Trichosporon pullulan*, *Cryptococcus curvatus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides* και *Yarrowia lipolytica*.

Το βιοντίζελ είναι ένα ανανεώσιμο καύσιμο που παράγεται με μεθυλίωση των τριγλυκεριδίων με αλκοόλη, ενώ η αντίδραση καταλύεται χημικά ή ενζυμικά (Εικόνα 1.9).

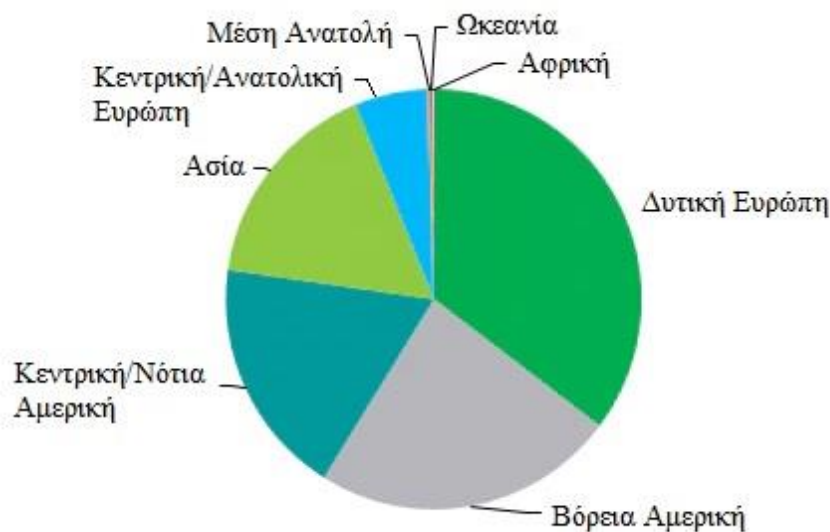


Εικόνα 1.9 Αντίδραση παραγωγής βιοντίζελ

Η χρήση βιοκαυσίμων όπως αυτό θεωρείται μια από τις καλύτερες επιλογές για τη μείωση εκπομπών CO<sub>2</sub>. Από τη στιγμή που το βιοντίζελ προέρχεται από τα φυτά, το παραγόμενο CO<sub>2</sub> δεν είναι περισσότερο από αυτό που απορροφά το φυτό κατά την ανάπτυξή του, καθιστώντας έτσι μηδενική την εκπομπή του. Παρόλο που πολλές χώρες όπως οι Η.Π.Α., η Αυστραλία και χώρες της Ασίας παρήγαγαν βιοντίζελ, το περισσότερο από αυτό ήταν πρώτης γενιάς, προερχόμενο από εδάδιμα ή καλλιεργήσιμα φυτικά έλαια. Αυτό οδηγεί σε μείωση των φυτικών ελαίων που πάνε για διατροφική κατανάλωση και αύξηση της τιμής των τροφίμων. Η αναζήτηση για πρώτη ύλη με σκοπό την αντικατάσταση των εδάδιμων φυτικών λιπών οδήγησε στο βιοντίζελ δεύτερης γενιάς με πρώτες ύλες απόβλητα όπως το μαγειρεμένο λάδι και το ζωικό λίπος, που όμως η χρήση τους δεν μπορεί να καλύψει τις ανάγκες για ανανεώσιμα καύσιμα (Zhu, 2008).



**Γράφημα 1.2** Το ποσοστό των πρώτων υλών για παραγωγή βιοντίζελ στις Η.Π.Α. για το 2015 (EIA Monthly Biodiesel Production Report, 2016)



**Γράφημα 1.0.3** Παγκόσμια κατανάλωση βιοντίζελ για το 2017 (HIS Markit, 2018)

Πολλά υποσχόμενη πηγή λιπιδίων είναι η τρίτης γενιάς βιοντίζελ με πρώτη ύλη το μικροβιακό λίπος από ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ως ελαιογόνοι θεωρούνται οι μικροοργανισμοί που συσσωρεύουν λίπος σε ποσοστό περισσότερο από το 20% του ξηρού βάρους του και σε μερικές περιπτώσεις μέχρι και 60-70%. Προτιμότερος μικροοργανισμός για παραγωγή μικροβιακού λίπους είναι η ζύμη σε σύγκριση με τα βακτήρια και τα μικροφύκη.

Παρά τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν, όπως το γεγονός ότι δεν απαιτούν γη για να αναπτυχθούν, τα μικροφύκη έχουν περιορισμό στη χρήση πηγής άνθρακα, αφού δεν μπορούν να μετατρέψουν το άμυλο σε λίπος και έχουν μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης από τις ζύμες. Μόνο λίγα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μικροβιακού λίπους, καθώς τα περισσότερα παράγουν λιποειδή σύμπλοκα όπως πολυαλκανοϊκούς υδροξυεστέρες στην εξωτερική τους μεμβράνη και είναι δύσκολο να εκχυλιστεί. Ορισμένοι μύκητες αναπτύσσονται σε άμυλο, αλλά παράγουν μικρή ποσότητα βιομάζας. Από την άλλη, ζύμες όπως *Rhodoturla glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Cryptococcus curvatus*, *Trichosporon fermentans* και *Lipomyces starkeyi* είναι ικανές να αναπτυχθούν σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων λυμάτων γεωργικών ή βιομηχανικών αποβλήτων και να παράξουν μεγάλη ποσότητα λίπους. Επιπλέον, η καλλιέργεια της ζύμης είναι λιγότερο ευαίσθητη σε ιογενή μόλυνση, ενώ η βακτηριακή μπορεί να ελεγχθεί εύκολα χαμηλώνοντας το pH.

Στο μέλλον είναι πολύ πιθανόν η τιμή του πετρελαίου να αυξηθεί λόγω της σπανιότητας του. Αυτό δίνει μια ευκαιρία να γίνει καλύτερη έρευνα στη χρήση του μικροβιακού λίπους ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ, το οποίο μπορεί να παρέχεται όλες τις εποχές του χρόνου, χωρίς την κατανάλωση πόσιμου νερού και με αρνητικό αποτύπωμα άνθρακα.

Οι διαδικασίες εκχύλισης του μικροβιακού λίπους είναι απλούστερες σε σχέση με την εκχύλιση λίπους από φυτά. Η εκχύλιση φυτικού λίπους περιλαμβάνει την επεξεργασία του φυτού, όπως την άλεση των σπόρων και του ιστού και εκχύλιση των λιπαρών. Από την άλλη, το μικροβιακό λίπος μπορεί να εκχυλιστεί απευθείας στην υδατική φάση, ή με απλή διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Bharathiraja, 2017).

Η ξήρανση της κυτταρικής βιομάζας πριν την εκχύλιση οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού λίπους κατά την εκχύλιση. Ωστόσο, η ξήρανση αποτελεί ενεργοβόρα διαδικασία κι έτσι διάφοροι μέθοδοι έχουν δοκιμαστεί όπως οι υπέρηχοι, η ομογενοποίηση σε υψηλή πίεση, τα μικροκύματα, η ενζυματική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων και η όξινη υδρόλυση σε κύτταρα υγρής βιομάζας, ώστε να επιτευχθεί υψηλή απόδοση σε μικροβιακό λίπος. Σε περίπτωση που το μικροβιακό λίπος προορίζεται ως πρώτη ύλη για βιοντίζελ, μπορεί να εφαρμοστεί μετεστεροποίηση τόσο σε ξηρή όσο και σε υγρή βιομάζα, παράλληλα με την εκχύλιση (Jin, 2015).

Αφού το λίπος εκχυλιστεί είναι απαραίτητη η ανάλυση της σύστασής του σε λιπαρά οξέα, η οποία θα καθορίσει και την μελλοντική χρήση αυτών των λιπιδίων. Η ανάλυση γίνεται με αέρια χρωματογραφία ή FTIR φασματοσκοπεία.

Υπάρχουν συγκεκριμένες παράμετροι για την επιλογή του μικροβιακού λίπους ως κατάλληλο για παραγωγή βιοντίζελ. Μια από αυτές είναι ο αριθμός κετανίου ο οποίος εκφράζει την ικανότητα ενός καυσίμου να αναφλεγεί. Όσο υψηλότερος είναι τόσο γρηγορότερα γίνεται η ανάφλεξη. Όταν μικροβιακά λίπη πλούσια σε μυριστικό, παλμιτικό, στεατικό και ελαϊκό οξύ μετεστεροποιήθηκαν σε εστέρες λιπαρών οξέων, βρέθηκαν να έχουν αριθμό κετανίων πάνω από 40, με τα συμβατικά καύσιμα να διαθέτουν από 40 μέχρι 55. Τα σημεία θόλωσης και απόχυσης είναι η υψηλότερη θερμοκρασία που παρατηρείται διαχωρισμός κρυστάλλων παραφίνης από το καύσιμο όταν αυτό ψυχθεί και η θερμοκρασία που ο διαχωρισμός παραφίνης είναι τόσο έντονος που δεν επιτρέπει στο καύσιμο να είναι ρευστό, όταν ψυχθεί, αντίστοιχα. Το βιοντίζελ υψηλής σύστασης σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα παρουσιάζει χαμηλά σημεία θόλωσης και απόχυσης. Η οξειδωτική σταθερότητα είναι μια παράμετρος που καθορίζει το χρόνο ζωής ενός καυσίμου χωρίς να χάσει τις ιδιότητές του. Μικρές ποσότητες των πιο ακόρεστων λιπαρών οξέων προκαλούν ταχεία οξείδωση. Τέλος, το ιξώδες επηρεάζει τον ψεκάσμο του καυσίμου στον θάλαμο καύσης, ενώ όσο υψηλότερο είναι αυτό, τόσο πιο πολλές πιθανότητες υπάρχουν να εναποτεθεί ποσότητα καυσίμου στον κινητήρα. Οι αιθυλικοί εστέρες λιπαρών οξέων παρουσιάζουν μεγαλύτερο ιξώδες από τους μεθυλικούς. (Bharathiraja 2017).

Η χρήση του μικροβιακού λίπους δεν περιορίζεται μόνο ως πρώτη ύλη για βιοντίζελ. Ανάλογα με τη σύσταση του και το είδος των λιπαρών οξέων που περιέχει, μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο πρόσθετο σε τρόφιμα για την διατροφή του ανθρώπου. Συγκεκριμένα πολυ-ακόρεστα λιπαρά οξέα συνιστώνται για την πρόληψη ή την θεραπεία καρδιαγγειακών και φλεγμονωδών παθήσεων, εγκεφαλικών διαταραχών, καρκίνων και αυτοάνοσων νοσημάτων (Bellou, 2016). Επίσης, δύναται να αντικαταστήσει το φυτικό λίπος σε περιπτώσεις όπως το φοινικέλαιο, το λίπος του κακάο και άλλα. Μαζί με άλλους μικροβιακούς μεταβολίτες, το μικροβιακό λίπος μπορεί να προσδώσει σε τρόφιμα ιδιότητες παίζοντας ρόλο σταθεροποιητικού παράγοντα, γαλακτοματοποιητή, παράγοντα αύξησης του ιξώδους κλπ. Ακόμα μια ιδιότητα του μικροβιακού λίπους είναι η καταστολή ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών που μπορεί να εφαρμοστεί στα τρόφιμα αντικαθιστώντας ή μειώνοντας έτσι τα χημικά συντηρητικά μέχρι και την συντήρησή τους στην κατάψυξη.

Τέλος, το μικροβιακό λίπος βρίσκει εφαρμογές στην παρασκευή φαρμακευτικών και καλλυντικών σκευασμάτων, όπως αλοιφές, και στην παραγωγή λιπαντικών.



## 1.5 *Lipomyces starkeyi*

Ο μικροοργανισμός *Lipomyces starkeyi* έχει φυλογενετικά την ακόλουθη καταταξη Fungi, Ascomycota, Saccharomycotina, Saccharomycetes, Saccharomycetidae, Saccharomycetales, *Lipomycetaceae*, *Lipomyces starkeyi*. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν 16 είδη που γίνονται αποδεκτά ως γένος *Lipomyces*. Ανάμεσα σε αυτά, ο *Lipomyces starkeyi* (μαζί με τον *Lipomyces lipofer* σε μικρότερο βαθμό) είναι η ζύμη με την πιο εκτεταμένη μελέτη, που επιλέχθηκε για την εξαιρετική της ικανότητα να παράγει λίπος. Ο *L. starkeyi* (επιστημονική ονομασία *L. starkeyi* Lodder & Kregger van Rij) είναι μια μονοκύτταρη ευκαρυωτική ζύμη, με έναν πυρήνα και άλλα οργανίδια. Το στέλεχος αυτό προήρθε από το έδαφος των Η.Π.Α. και απομονώθηκε από τον R.L Starkey. Αναπαράγεται αναπτύσσοντας 4-20 ελλειψοειδή ή στρογγυλά ασκοσπόρια ανά ασκό. Στη συνέχεια, τα ασκοσπόρια, με χρώμα ανοιχτό πορτοκαλί με καφέ, βλασταίνουν και διαιρούνται με εκβλάστηση. Μακρομορφολογικά, η αποικία φαίνεται να είναι λεία με λευκή-κρεμώδη εμφάνιση και βλεννώδη υφή (Εικόνα 1.10). Το είδος αναπαράγεται με πολυμερή εκβλάστηση που έχει ως αποτέλεσμα στρογγυλά ή ωοειδή κύτταρα. Η βέλτιστη θερμοκρασία για τη συσσώρευση λίπους από τον *L. starkeyi* βρέθηκε 25,5-29,5 °C.



**Εικόνα 1.10** Καλλιέργεια του *Lipomyces starkeyi* (Westerdijkinstituut)

Η ζύμη αποτελείται από οργανικές και ανόργανες ενώσεις και νερό. Μετά την απομάκρυνση του νερού, που αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της ζύμης, απομένουν οι οργανικές και οι ανόργανες ενώσεις. Οι οργανικές ενώσεις είναι πολυσακχαρίτες, λιπίδια και

πρωτεΐνες, ενώ οι ανόργανες περιλαμβάνουν συμπράγοντες και ιχνοστοιχεία. Τα οργανίδια των κυττάρων των ζυμών αποτελούνται από: 1) το κυτταρικό τοίχωμα, το 80-90% του οποίου είναι πολυσακχαρίτες σύνθεσης κυρίως γλυκάνης, μαννάνης, χιτίνης, 2) την κυτταρική μεμβράνη, που αποτελείται από λιπιδική διπλοστιβάδα συνδεδεμένη με πρωτεΐνες μεμβράνης, χοληστερίνη και γλυκολιπίδιο, 3) το κυτοσόλιο, υγρό όπου βρίσκονται άλλα οργανίδια, 4) τον πυρήνα που περιέχει το γενετικό υλικό της ζύμης, 5) το ριβόσωμα, που γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση, 6) τα μιτοχόνδρια, όπου μετατρέπεται η τροφή σε ενέργεια, 7) το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου μεταφέρονται μόρια μέσα στο κύτταρο, 8) το σύμπλεγμα Golgi, οργανίδιο όπου τροποποιούνται και μεταφέρονται οι πρωτεΐνες και 9) το κενοτόπιο, ως αποθήκη τροφής.

Σημαντικοί παράγοντες που επιδρούν στην συσσώρευση λίπους στις ζύμες είναι η θερμοκρασία, το pH, το διαλυτό οξυγόνο και η αναλογία άνθρακα/αζώτου στο μέσο. Μια παλαιότερη έρευνα στον *L. starkeyi* IAM 4753 που αναπτύχθηκε αναερόβια σε ένα απλό μέσο στους 30 °C έδειξε ότι η συσσώρευση λιπιδίων ήταν μειωμένη κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αύξησης (λογαριθμική φάση), ενώ αυξήθηκε σημαντικά όταν η ζύμη βρισκόταν στην αρχή της στατικής φάσης, μια αλλαγή του μεταβολισμού που πιθανά οφείλεται στην περιορισμένη ποσότητα διαλυτού οξυγόνου (Uzuka et al., 1985). Στην εργασία των Suutari et al. (1993) παρατηρήθηκε ένα παρόμοιο φαινόμενο, στο οποίο η ζύμη άρχισε να συσσωρεύει λίπος στην διάρκεια της φάσης ανάπτυξης και η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν οι 28 °C για την παραγωγή βιομάζας και λίπους.

Η έρευνα στον *L. starkeyi* IAM 4753 έδειξε ότι μπορεί να αναπτυχθεί επιτυχώς σε μέσο γλυκόζης σε pH 5, ενώ σε υψηλότερο pH μπορεί να ανασταλεί η δράση ενζύμων που παράγουν βιοτίνη, η οποία προάγει την κυτταρική ανάπτυξη. Επιπλέον, βρέθηκε πως σημαντική για τα κύτταρα ήταν η παρουσία κατιόντων και ανιόντων. Τα  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  και  $Zn^{2+}$  ήταν σημαντικά για τη ζύμωση, την κυτταρική ανάπτυξη και τον μεταβολισμό, ενώ τα  $Cu^{2+}$  και  $Fe^{2+}$  χρειάστηκαν ως συμπράγοντες. Τα φωσφορικά και θειικά ήταν απαραίτητα για τα δομικά μόρια και την φυσιολογία των κυττάρων, αντίστοιχα. Χρειάστηκε επαρκής ποσότητα  $Mn^{2+}$  για την αύξηση της βιομάζας 1,6 φορές, ενώ η λίγη ποσότητα  $Zn^{2+}$  ήταν απαραίτητη για να επιτευχθεί υψηλότερη συσσώρευση λίπους. Μια μετέπειτα μελέτη έδειξε πως η ταυτόχρονη προσθήκη  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  και φωσφορικού καλίου στη στατική φάση ήταν ικανή να προκαλέσει αύξηση της παραγωγής βιομάζας, αλλά όχι του λίπους (Sutanto et al., 2018).

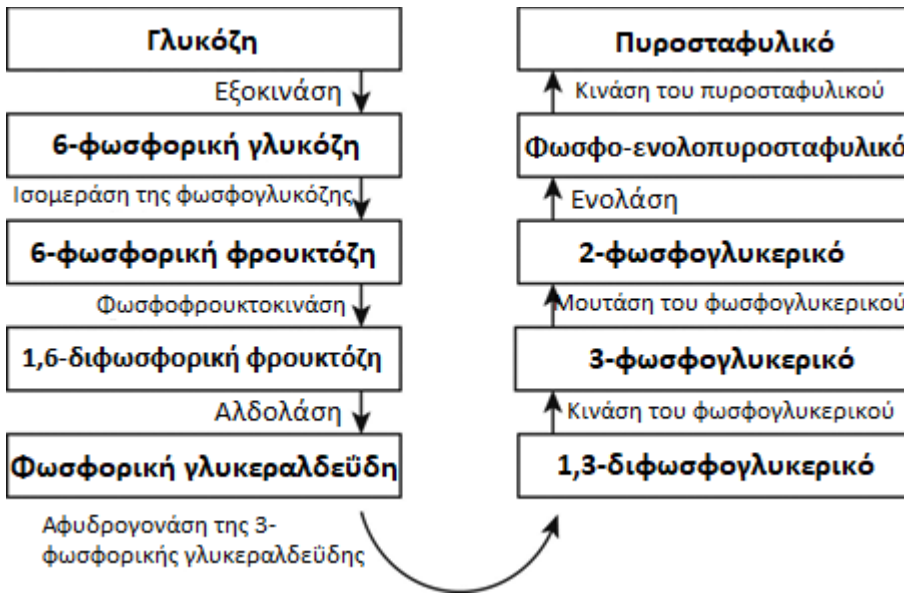
### 1.5.1 Βιοσύνθεση λίπους

Ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό των ελαιογόνων ζυμών είναι η ικανότητά τους να παρέχουν συνεχώς ακέτυλο-CoA και επαρκή ποσότητα NADPH που είναι σημαντικά για σχηματισμό λιπιδίων. Πηγές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή ακέτυλο-CoA είναι τα λιπαρά οξέα, τα αμινοξέα και τα σάκχαρα. Η βιοσύνθεση λιπιδίων στις ζύμες γίνεται με 2 τρόπους, ανάλογα με το υπόστρωμα: *de novo* και *ex novo*. Στη *de novo* βιοσύνθεση, η συσσώρευση λίπους ξεκινά με μια περίσσεια πηγής άνθρακα, συνήθως σάκχαρα, και περιορισμένη θρεπτική ουσία, συνήθως άζωτο στο υπόστρωμα. Η επιπλέον πηγή άνθρακα πλέον δεν χρησιμοποιείται για την κυτταρική ανάπτυξη, αλλά διοχετεύεται προς την συσσώρευση λίπους μέσω της κυτταρικής αναπνοής. Η κυτταρική αναπνοή είναι μια διαδικασία μετατροπής της τροφής σε ενέργεια που συμβαίνει σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς.

Σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, έτσι και στις ζύμες, λαμβάνουν χώρα πολυάριθμες χημικές αντιδράσεις που επιτρέπουν σε αυτούς να συνθέτουν μακρομόρια και βιομόρια ειδικού βιολογικού ρόλου, καθώς και μεταβολίτες, δηλαδή μόρια χαμηλού μοριακού βάρους. Αντιδράσεις όπως η βιοσύνθεση και αποικοδόμηση αμινοξέων, πρωτεϊνών, πουρινών, νουκλεοτιδίων, σακχάρων, λιπαρών οξέων και άλλων, αφορούν στο μεταβολισμό της ενέργειας και την ανάπτυξη των κυττάρων. Το σύνολο των αντιδράσεων αποικοδόμησης ονομάζεται καταβολισμός και στόχος είναι η παραγωγή ενέργειας και η παραγωγή πρόδρομων ουσιών για τη σύνθεση συστατικών των κυττάρων. Από την άλλη, το σύνολο των αντιδράσεων σύνθεσης ονομάζεται αναβολισμός, που έχει ως σκοπό τη σύνθεση μοριακών συστατικών του κυττάρου όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λίπη με πρώτη ύλη μόρια μικρού μοριακού βάρους.

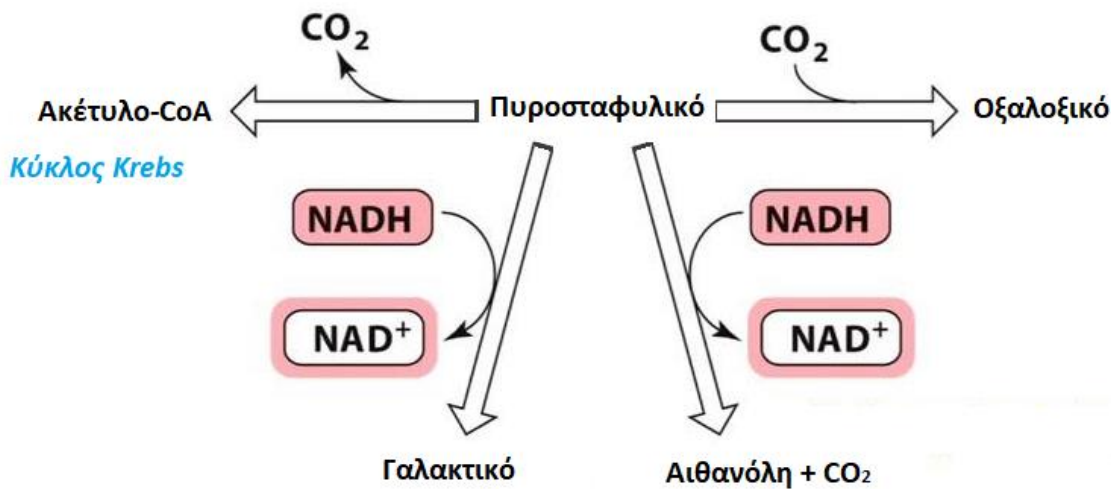
Οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί μπορούν να καταβολίζουν μεγάλη ποικιλία σακχάρων. Αρχικά, τα σάκχαρα αποδομούνται σε απλούστερα μόρια και εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Εκεί μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ ακολουθώντας την γλυκολυτική οδό που στις ζύμες, και στους περισσότερους μικροοργανισμούς, είναι η Embden-Mayerhof-Parnas που πραγματοποιείται στο κυτόπλασμα (Εικόνα 1.11). Η συνολική αντίδραση της μετατροπής της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό είναι:





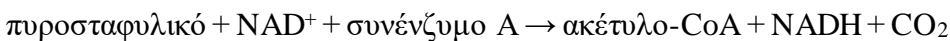
Εικόνα 1.11 Τα στάδια της γλυκόλυσης περιληπτικά (Chegg)

Αναλόγως με τις συνθήκες καλλιέργειας το πυροσταφυλικό οξύ μπορεί να μετατραπεί σε πληθώρα ενώσεων.



Εικόνα 1.12 Διάφορες τύχες του πυροσταφυλικού

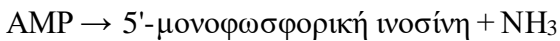
Όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα, μια από αυτές τις ενώσεις είναι το ακετυλοσυνένζυμο-A (ακέτυλο-CoA) που παράγεται στο μιτοχόνδριο με τη βοήθεια του πολυενζυμικού συμπλόκου της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDC).



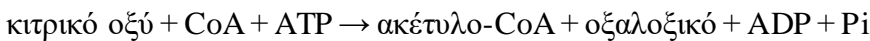
Το ακέτυλο-CoA καταβολίζεται περαιτέρω μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέως ή αλλιώς κυκλού Krebs στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Ο κύκλος Krebs συμβάλει στην παραγωγή

μικρής ποσότητας ενέργειας και στη σύνθεση ανθρακούχων ουσιών που προορίζονται για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, αμινοξέων, κ.ά.

Για να ξεκινήσει η διαδικασία συσσώρευσης μικροβιακού λίπους στον ελαιογόνο μικροοργανισμό χρειάζεται πηγή άνθρακα και περιορισμένη ποσότητα αζώτου. Καθώς ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται, θα εξαντλήσει γρήγορα το άζωτο, αλλά θα συνεχίσει να καταναλώνει την πηγή άνθρακα (Ratledge, 2004), μετατρέποντας το σε ενδοκυτταρικό λίπος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, αυξάνεται η δράση της AMP ααμινάσης για να διασπάσει την AMP και να παραχθεί αμμωνία για την παροχή αζώτου στα κύτταρα.

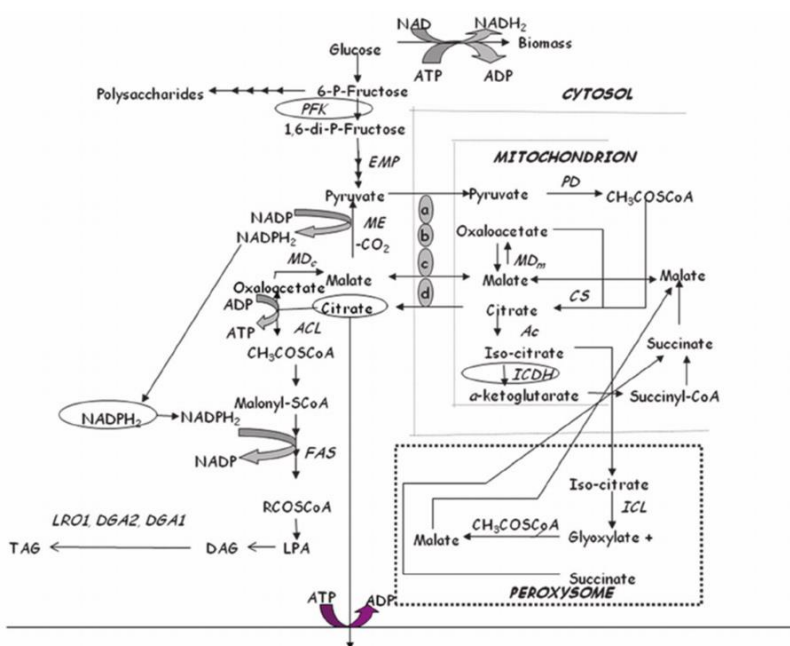


Σαν αποτέλεσμα σταματάει η δράση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (ICDH) κι έτσι το ισοκιτρικό οξύ δεν μετατρέπεται σε α-κετογλουταρικό. Το ισοκιτρικό μετατρέπεται πάλι σε κιτρικό οξύ από το ένζυμο ακονιτάση, το οποίο συσσωρεύεται και εισέρχεται στο κυτοσόλιο, δίνοντας ακετύλο-CoA, με το ένζυμο κιτρική λύαση, και οξαλοξικό οξύ.



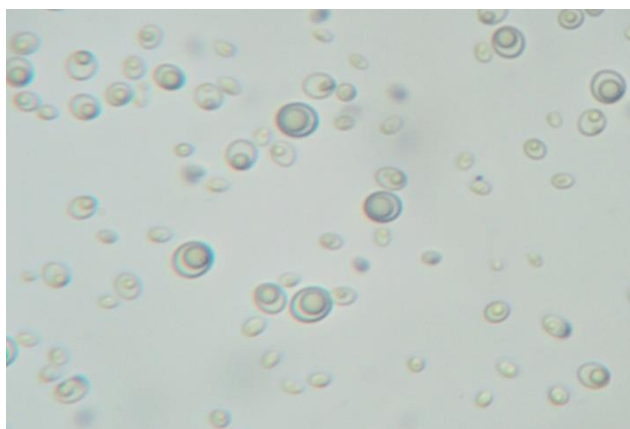
Το ακετύλο-CoA καρβοξυλιώνεται σε μαλόνυλο-CoA από το ένζυμο AAC1 και τόσο το ένα όσο και το άλλο συνεχίζουν στην βιοσύνθεση λιπαρών οξέων (FA). Τα λιπαρά οξέα, στη συνέχεια, συνδέονται με την γλυκερόλη, η οποία παράγεται από την αφυδρογονάση της 3-φωσφο-γλυκερόλης (GDH), για να σχηματίσουν τριακυλογλυκερόλη (TAG).

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται το μεταβολικό μονοπάτι της ζύμης *Lipomyces starkeyi* μετατροπής της γλυκόζης σε τριακυλογλυκερόλη (TAGs).



Εικόνα 1.13 Μεταβολικό μονοπάτι του *Lipomyces starkeyi* (Papanikolaou et al, 2008).

Η συσσώρευση λίπους απαιτεί η αναλογία ακέτυλο-CoA:NADPH να είναι 1:2 Μ. Γενικά, το NADPH παρέχεται από το μηλικό ένζυμο και στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Εν τω μεταξύ, η επιμήκυνση και ο αποκορεσμός των λιπαρών οξέων σε DAG και TAG συμβαίνουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Βάσει αυτού του σταδίου, οι περισσότερες ελαιογόνες ζύμες θεωρητικά θα είχαν απόδοση 31,6% παραγωγής TAG από τη γλυκόζη. Βρέθηκε, όμως, πως το κυτοσολικό μηλικό ένζυμο στον *L. starkeyi* προτιμάει να παίρνει NAD<sup>+</sup> ως συνένζυμο παρά NADP<sup>+</sup> που θεωρητικά δεν παρέχει NADPH στο κυτοσόλιο. Έτσι, η πηγή NADPH στον *L. starkeyi* εικάζεται να είναι μόνο το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών και θεωρητικά η απόδοση παραγωγής TAG από γλυκόζη να πέφτει στο 27,6% (Sutanto et al., 2018).



**Εικόνα 1.14** Συσσώρευση μικροβιακού λίπους από τη ζύμη *Lipomyces starkeyi*.

### 1.5.2 Ένζυμα που παίρνουν μέρος κατά την βιοσύνθεση λιπιδίων στις ελαιογόνους ζύμες

Η συσσώρευση λίπους λαμβάνει χώρα υπό την δράση ορισμένων ενζύμων όπως η 6-φωσφορογλυκονική αφυδρογονάση (PGDH), την αφυδρογονάση της 3-φωσφο-γλυκερόλης (GDH), την ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH), την ATP κιτρική λυάση (ACL), την καρβοξυλάση του ακετυλοσυνενζύμου Α (ACC) και το μηλικό ένζυμο (ME). Η δράση των ενζύμων 6-PGDH, ME και ACC είναι υψηλή κατά την συσσώρευση λίπους και μπορεί να αυξηθεί προσθέτοντας στο μέσο Mn<sup>+2</sup> για να προωθήσει την αντίδραση. Από την άλλη, το GDH είναι πολύ ευαίσθητο στο Zn<sup>+2</sup>, του οποίου η μεγαλύτερη περιεκτικότητα μπορεί να οδηγήσει σε λιγότερη συσσώρευση λιπιδίων.

Το ένζυμο ICDH, που παίρνει μέρος στον κύκλο του Krebs μετατρέποντας το ισοκιτρικό σε α-κετογλουταρικό οξύ, βρέθηκε να εμφανίζει μεγάλη δραστηριότητα σε ελαιογόνες ζύμες υπό περιορισμένη παροχή αζώτου. Η μελέτη των Naganuma et al. (1987)

έδειξε πως η δράση του ICDH ήταν υψηλή στην αρχή της ζύμωσης αλλά μειωνόταν δραματικά προς το τέλος της (48 h), ενώ τόσο το ενδοκυτταρικό όσο και το εξωκυτταρικό κιτρικό οξύ αυξανόταν σταδιακά.

Ένας απαραίτητος παράγοντας της συσσώρευσης λίπους είναι η παρουσία του ενζύμου ACL. Μετατρέπει το κιτρικό οξύ σε ακέτυλο-CoA, ως πρόδρομο της βιοσύνθεσης λίπους, και οξαλοξικό οξύ. Σε οργανισμούς που συσσωρεύαν λίπος μεγαλύτερο από 20% ως TAG, βρέθηκε να έχει δράση το ένζυμο ACL, όπως και σε έναν μικρό αριθμό ζυμών που όμως συσσωρεύαν πολύ μικρό ποσοστό λίπους. Συμπερασματικά, η παρουσία του ACL δεν μπορεί να θεωρηθεί χαρακτηριστικό ενός ελαιογόνου οργανισμού.

Το ένζυμο ME είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία μιας ομάδας NADPH, που στη συνέχεια συνδυάζεται με ακέτυλο-CoA για να ξεκινήσει η βιοσύνθεση λιπιδίων. Εάν για κάποιο λόγο ανασταλλεί η δράση αυτού του ενζύμου, τότε το κύτταρο δεν θα είναι σε θέση να συνθέσει λιπίδια. Από την άλλη, το ένζυμο ACC βοηθά στο σχηματισμό του μαλόνυλο-CoA που ξεκινά την βιοσύνθεση λιπαρών οξέων (Sutanto et al., 2018).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός**

Ο αναγκαίος εργαστηριακός εξοπλισμός (συσκευές, αντιδραστήρια, υλικά, μηχανήματα), για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μελέτης, εξασφαλίστηκαν από τα Εργαστήρια Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, και Χημείας Τροφίμων και Ανάλυσης, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

### **2.2 Πρώτη ύλη**

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε απόβλητο ζυθοποιίας και συγκεκριμένα υπολείμματα βύνης (brewer's spent grain), το οποίο συλλέχθηκε από παραγωγή μικρής παρτίδας μύρας τον Οκτώβρη του 2017, και παραχωρήθηκε από την Αθηναϊκή Ζυθοποιία Α.Ε που βρίσκεται στην περιοχή Αιγάλεω Αττικής. Το απόβλητο αποθηκεύτηκε στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω.

### **2.3 Ανάλυση σύστασης BSG**

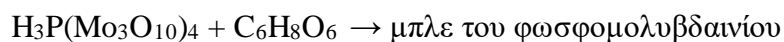
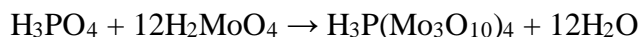
Για την ανάλυση της σύστασης του αποβλήτου χρησιμοποιήθηκε νωπό ή ξηρό BSG, πολτοποιημένο ή όχι, το οποίο θα αναφέρεται σε κάθε περίπτωση. Η ξήρανση του BSG πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της λυοφιλίωσης διάρκειας 24 – 48 ωρών όσο αυτό βρισκόταν υπό κατάψυξη. Κατά τη λυοφιλίωση το νερό μεταβαίνει από τη στερεή στην αέρια φάση απευθείας, με εξάχνωση, χωρίς να περάσει από το στάδιο της υγρής φάσης, χωρίς έτσι να αλλοιωθούν τα χαρακτηριστικά του.

Στη συνέχεια υγρό BSG διαλυμένο σε νερό φυγοκεντρήθηκε και στο υπερκείμενο πραγματοποιήθηκε ανάλυση για προσδιορισμό περιεκτικότητας σε ανόργανο φωσφόρο και σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων.

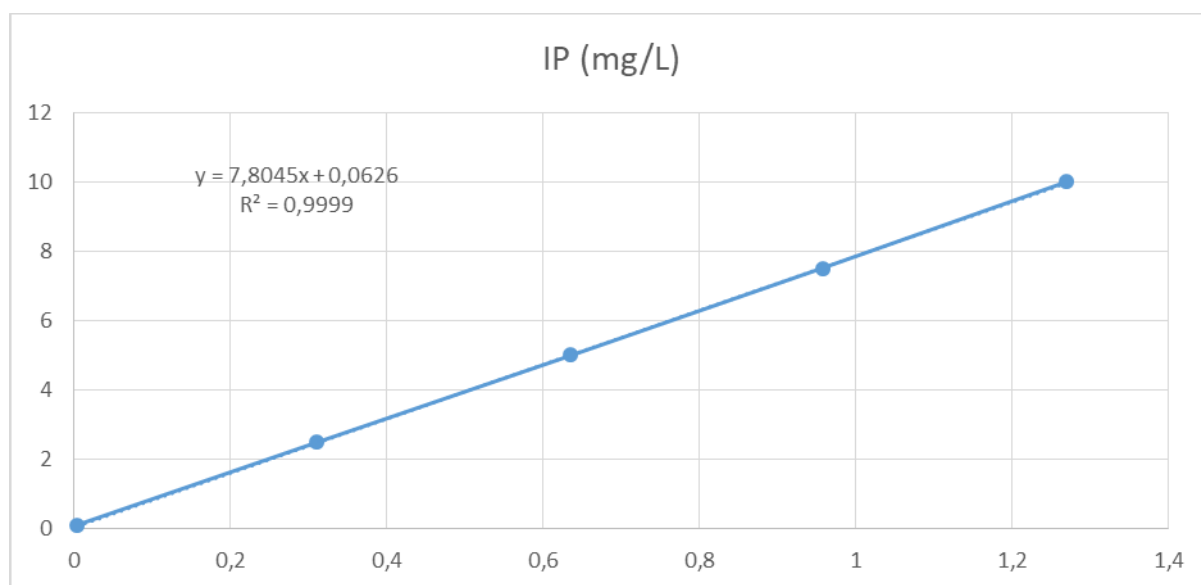
Παρουσία κατάλληλου αναγωγικού παράγοντα, τα φωσφορικά μπορούν να αντιδράσουν εύκολα με μολυβδαινικά ιόντα σε ασθενές όξινο περιβάλλον για να σχηματίσουν ένα μπλε σύμπλοκο. Η συγκέντρωση των φωσφορικών στο διάλυμα είναι ευθέως ανάλογη με την ένταση αυτού του έγχρωμου συμπλόκου. Ο σχηματισμός του μπλε του



φωσφομολυβδαινίου προκαλείται από την αναγωγή του σχηματιζόμενου φωσφορομολυβδαινικού οξέος από το ασκορβικό οξύ. Οι αντιδράσεις που παίρνουν μέρος είναι οι εξής:



Αρχικά, τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα με απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 5 ml. Στη συνέχεια προστέθηκε σε κάθε ένα 0,4 ml υπερχλωρικού οξέος ( $\text{HClO}_4$ ) 60% (v/v) και ακολούθησε ανάδευση 10 δευτερολέπτων. Έπειτα, προστέθηκαν 0,3 ml ασκορβικού οξέος ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) συγκέντρωσης 10 g/L. Ακολούθησε ανάδευση 10 δευτερολέπτων και στη συνέχεια προστέθηκαν 0,4 ml μολυβδαινικού αμμωνίου ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ), συγκέντρωσης 50 g/L και το δείγμα αναδεύτηκε εκ νέου για ακόμα 10 δευτερόλεπτα. Τέλος, τα δείγματα έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στη συνέχεια φωτομετρήθηκαν στα 730 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Η ίδια διαδικασία έγινε και στον προσδιορισμό φωσφόρου σε πρότυπα διαλύματα  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  σε συγκεντρώσεις 0,1, 2,5, 5, 7,5, 10 mg/L βάσει των οποίων κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη (Γράφημα 2.1).

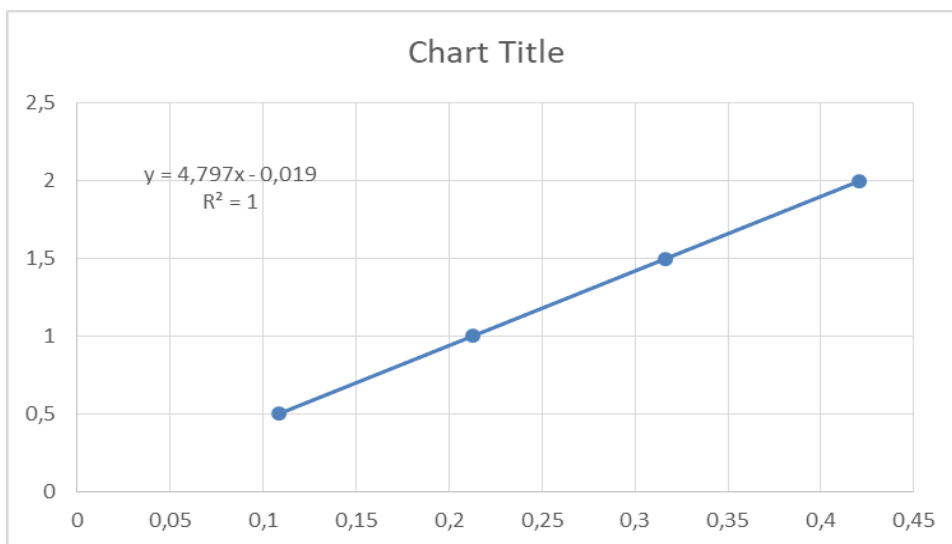


**Γράφημα 2.1** Πρότυπη καμπύλη  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  για τον προσδιορισμό ανόργανου φωσφόρου

Η μέθοδος προσδιορισμού αζώτου των ελευθέρων αμινομάδων (FAN) πρόκειται για μια αναλυτική φωτομετρική μέθοδο κατά την οποία η νινυδρίνη αντιδράει με τις ελεύθερες αμινομάδες των πεπτιδίων και των αμινοξέων με σκοπό να προσδιοριστεί το άζωτο αυτών.

Η αντίδραση της νινυδρίνης με τα αμινοξέα υπό θέρμανση έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μωβ χρωμοφόρων ομάδων.

Πιο συγκεκριμένα, 1 ml αραιωμένου δείγματος αναμείχθηκε με 0,5 ml από το αντιδραστήριο χρώσης (Color Reagent) και αναδεύτηκαν. Τα δείγματα έμειναν σε water bath ρυθμισμένο στους 100 °C για 16 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε πάγο για 20 λεπτά με σκοπό την διακοπή της αντίδρασης. Έπειτα, στα δείγματα προστέθηκαν 2,5 ml από το αντιδραστήριο αραιώσης (Dillution Reagent) και αναδεύτηκαν για 20 δευτερόλεπτα. Η φωτομέτρηση έγινε στα 570 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν δείγματα γλυκίνης συγκεντρώσεων 0,5, 1, 1,5, 2 mg/L (Γράφημα 2.2).



**Γράφημα 2.2** Πρότυπη καμπύλη γλυκίνης, για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινοξέων

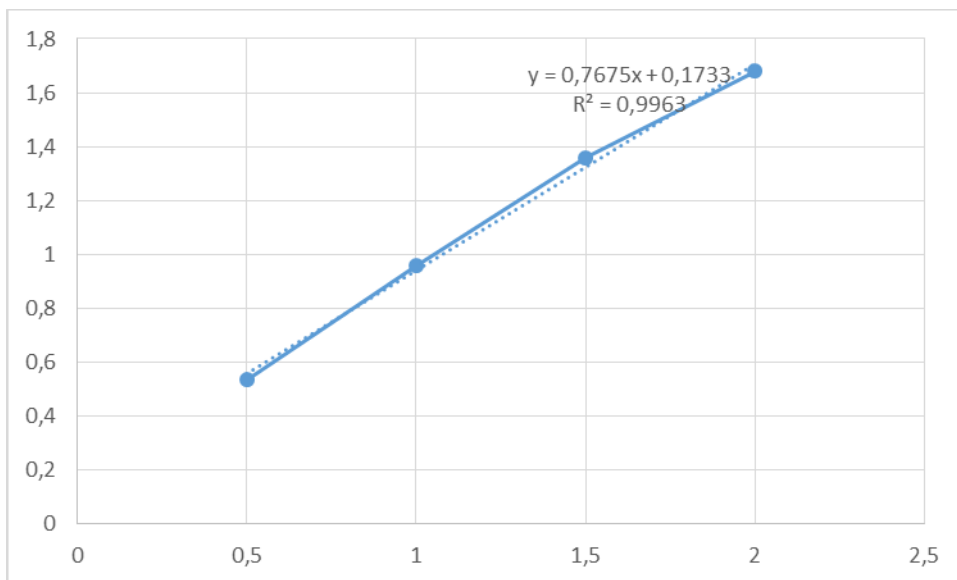
Για την παρασκευή του Color Reagent χρησιμοποιήθηκαν 49.71 g/L ένυδρο φωσφορικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 3 g/L φρουκτόζη, 5 g/L νινυδρίνη και 60 g/L δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Το  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  προστέθηκε παράλληλα με τη ρύθμιση του pH το οποίο πρέπει να κυμαίνεται από 6,6 – 6,8. Το διάλυμα αποθηκεύτηκε εν συνεχεία σε σκούρο μπουκάλι σε θερμοκρασία 4 °C.

Για το Dillution Reagent χρησιμοποιήθηκαν 2 g/L ιωδικό κάλιο ( $\text{KIO}_3$ ) διαλύθηκαν σε 616 ml απιονισμένο νερό και στη συνέχεια προστέθηκαν 384 ml καθαρής αιθανόλης (EtOH 96%).

Με σκοπό τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στο απόβλητο, ήταν αναγκαία πρώτα η εκχύλιση τους από αυτό, λεπτομέρειες της οποίας θα αναφερθούν στη συνέχεια.

Η ανάλυση σύστασης ολικών φαινολικών στο εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Αρχή της μεθόδου είναι η αναγωγή διαλύματος Folin-Ciocalteu (φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικό οξύ) σε φωσφορομολυβδενικό/φωσφοροβολφραμικό-φαινολικό σύμπλοκο και αλλαγή χρώματος σε μπλε. Είναι απαραίτητο, για την αντίδραση, το περιβάλλον να είναι αλκαλικό κι αυτό ρυθμίζεται με την προσθήκη  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Πιο συγκεκριμένα, σε 50  $\mu\text{L}$  από κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 450  $\mu\text{L}$  απιονισμένου νερού, 2,5 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu 0,2 N και ακολούθησε ανάδευση για 5 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν στα δείγματα 2 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  75 g/L και μετά από ανάδευση 1,5 ώρας στους 30 °C, το κάθε δείγμα φωτομετρήθηκε στα 765 nm. Ο προσδιορισμός της σύστασης σε ολικά φαινολικά συστατικά γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος συγκεντρώσεων 0,5, 1, 1,5, 2 g/L (Γράφημα 2.3). Η αναγωγική ικανότητα του γαλλικού οξέος είναι ισοδύναμη με την αναγωγική ικανότητα των φαινολικών συστατικών του εκχυλίσματος.



**Γράφημα 2.3** Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για τον προσδιορισμό της σύστασης σε ολικά φαινολικά συστατικά

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος προσδιορισμού της συνολικής πρωτεΐνης στα τρόφιμα είναι η μέθοδος Kjeldahl, η οποία βασίζεται στην ολική μετατροπή των οργανικών αζωτούχων συστατικών τους σε αμμωνιακά άλατα. Η μέθοδος αυτή, εκτός από τις πρωτεΐνες, συνυπολογίζει και τα νουκλεϊκά οξέα, την αμμωνία και τα αμμωνιακά άλατα.

0,5 g ξηρού BSG, μέσα σε ριζόχαρτο, τοποθετήθηκαν σε σωλήνα καύσης (σωλήνας Kjeldahl), μαζί με μία ταμπλέτα η οποία περιέχει θειικό κάλιο και θειικό χαλκό και δρα ως καταλύτης, 2 σταγόνες αντιαφριστικό και 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%. Το θειικό κάλιο αυξάνει το σημείο βρασμού του θειικού οξέος, ενώ ο θειικός χαλκός επιταχύνει την καύση. Οι πρωτεΐνες και τα υπόλοιπα οργανικά συστατικά του δείγματος χωνεύονται με πυκνό θειικό οξύ παρουσία του καταλύτη και μετατρέπονται ποσοτικά σε αμμωνιακά. Η καύση διαρκεί έως ότου το χρώμα του δείγματος καταστεί κυανοπράσινο διαυγές, λόγω του χαλκού που περιέχει ο καταλύτης. Μετά το τέλος της καύσης προστέθηκαν 100 ml νερού και ο σωλήνας καύσης μεταφέρθηκε στην συσκευή απόσταξης.

Το pH του προϊόντος της χώνευσης ρυθμίστηκε με 50 ml NaOH 50 % και η παραγόμενη αμμωνία αποστάχθηκε μέσα σε διάλυμα 50 ml βορικού οξέος (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 4%. Τα βορικά ανιόντα που προκύπτουν ογκομετρούνται με πρότυπο διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 0,1 M, παρουσία δείκτη μίγμα ερυθρού του μεθυλίου και πράσινου της βρωμοκρεσόλης. Τέλος, από την ποσότητα του HCl που καταναλώθηκε βρίσκεται η περιεκτικότητα αζώτου στο δείγμα, η οποία αν πολλαπλασιαστεί με τον συντελεστή 5,83 για το κριθάρι, προκύπτει η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη.



Εικόνα 2.1 Συσκευή απόσταξης Kjeldahl

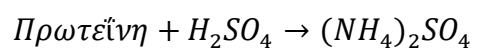


Εικόνα 2.2 Συσκευή υγρής καύσης

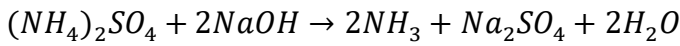
$$\%N = CHCl \times \frac{(V_{\text{δείγματος}} - V_{\text{τυφλού}})}{m_{\text{δείγματος}}} \times 1.4007$$

$$\% \text{πρωτεΐνη} = \%N \times 5.83$$

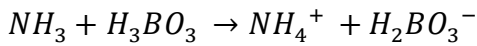
### Χώνευση



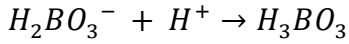
## Εξουδετέρωση



## Απόσταξη



## Ογκομέτρηση



Ο προσδιορισμός του ποσοστού λίπους στο απόβλητο ζυθοποιίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Soxhlet, που είναι μια μέθοδος επαναλαμβανόμενης εκχύλισης. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την παραλαβή ενός στερεού συστατικού από ένα μίγμα στερεών ουσιών, χρησιμοποιώντας έναν οργανικό διαλύτη. Σε αυτή την περίπτωση το BSG έπρεπε να είναι πολτοποιημένο, ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής με τον διαλύτη, και ξηρό, για να μπορέσει να εισέλθει ο υδρόφοβος διαλύτης.

Έτσι, το BSG τοποθετήθηκε σε πορώδες κύπελλο μέσα σε έναν θάλαμο εκχύλισης, και στη σφαιρική φιάλη ο διαλύτης που στην δική μας περίπτωση ήταν το εξάνιο. Καθώς ο διαλύτης περνούσε μέσα από το δείγμα, αυτό εξήγαγε τα λιπίδια εντός της φιάλης. Στο τέλος της διαδικασίας εκχύλισης, η οποία διήρκησε 4 ώρες, η φιάλη με τον διαλύτη και τα λιπίδια απομακρύνθηκε, ο διαλύτης εξατμίστηκε και η φιάλη ζυγίστηκε με σκοπό να υπολογιστεί το βάρος του λίπους.

Είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν από το BSG μη δομικά συστατικά, ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε παρεμβολή τους σε μεταγενέστερη ανάλυση. Αυτό επιτυγχάνεται με εκχύλιση αυτών των συστατικών με τη μέθοδο Soxhlet, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το νερό και στη συνέχεια την αιθανόλη (EtOH, 70 %). Στην πρώτη περίπτωση απομακρύνονται συστατικά διαλυτά στο νερό όπως ανόργανα συστατικά, μη δομικοί υδατάνθρακες και αζωτούχα συστατικά. Όσο αφορά τη χρήση αιθανόλης ως διαλύτη, εκεί απομακρύνονται κηροί και ιχνοστοιχεία.

Η διαδικασία αυτή διήρκησε 16 ώρες. Στο τέλος, ακόλουθησε ανάλυση ανόργανου φωσφόρου και προσδιορισμός αζώτου των ελευθέρων αμινομάδων στο εκχύλισμα. Από την άλλη στο στερεό έγινε προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη με τη μέθοδο Kjeldahl και προσδιορισμός κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης.



**Εικόνα 2.3** Συσκευές εκχύλισης Soxhlet

Στο BSG, αφού εκχυλίστηκε με διαλύτη νερό και αιθανόλη, έγινε ακόμα μια ανάλυση, αυτή της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης. Το στερεό, αφού τοποθετήθηκε σε φιάλες αναεροβίωσης μαζί με 3 ml θειικό οξύ ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  72 %) παρέμεινε σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 30 °C για 60 λεπτά υπό ανάδευση.

Εν συνεχεία, οι φιάλες απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο και το εσωτερικό τους αραιώθηκε προσθέτοντας 84 ml απιονισμένο νερό. Παράλληλα, σε μια ακόμα φιάλη αναεροβίωσης ετοιμάστηκε πρότυπο διάλυμα σακχάρων. Όλες οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε αυτόκλειστο αποστείρωσης για μία ώρα στους 121 °C. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, οι φιάλες ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου και το εσωτερικό τους διηθήθηκε σε ηθμό Büchner δια μέσου προζυγισμένου φίλτρου. Το φίλτρο με το στερεό της διήθησης, τοποθετήθηκε σε προσζυγισμένα πορσελάνινα χωνευτήρια τα οποία με τη σειρά τους σε φούρνο στους 575 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών τα χωνευτήρια μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα και αφού πήραν θερμοκρασία δωματίου, ζυγίστηκαν ώστε να υπολογιστεί η τέφρα.

Από την άλλη, ένα μέρος από το διήθημα φωτομετρήθηκε σε φάσμα UV-Vis στα 320 nm με σκοπό τον προσδιορισμό της όξινης διαλυτής λιγνίνης, ενώ ένα άλλο μέρος κρατήθηκε για ανάλυση σακχάρων και κυτταρίνης. Η ανάλυση αυτή έγινε με τη χρήση της στήλης Aminex και Shodex στην HPLC.

## 2.4 Βιοδυλιστήριο BSG

### 2.4.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από το BSG

Η εκχύλιση φαινολικών έγινε με διαλυτοποίηση υγρού BSG σε διαφορετικές αραιώσεις (1:20, 1:40, 1:80 (w dry/v)) σε 4 διαφορετικούς διαλύτες κάθε φορά: αιθανόλη (EtOH 70%), οξινισμένη αιθανόλη (EtOH 70% - HCl 2,4M) , ακετόνη (Me<sub>2</sub>CO 70%), οξινισμένη ακετόνη (Me<sub>2</sub>CO 70% - HCl 2,4 M). Τα πειράματα έγιναν και σε πολτομοιμημένο BSG. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 ml, σε τελικό όγκο 50 ml. Επίσης, δοκιμάστηκαν 2 τρόποι για την εκχύλιση τους, οι υπέρηχοι, όπου τα δείγματα παρέμειναν για 30 λεπτά, και ο επωαστήρας όπου έμειναν για 2 ώρες υπό ανάδευση. Στο υπερκείμενο του κάθε δείγματος απομακρύνθηκε ο διαλύτης μέσω εξάτμισης και τα στερεά υπολείμματα διαλύθηκαν σε μεθανόλη. Στα μεθανολικά εκχυλίσματα έγινε ανάλυση σύστασης ολικών φαινολικών συστατικών και μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας.

### 2.4.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε διάλυμα υγρού BSG σε νερό έγινε με την ισοηλεκτρική τους κατακρήμνηση. Το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης μπορεί να μεταβληθεί με την μεταβολή των πρωτονίων, αλλάζοντας το pH ή με την δέσμευση ιόντων σε πολικές ομάδες της πρωτεΐνης. Όσο μεγαλύτερο καθαρό φορτίο έχει η πρωτεΐνη τόσο πιο ευδιάλυτη είναι, ενώ όταν έχει καθαρό φορτίο μηδέν βρίσκεται στο σημείο ελάχιστης διαλυτότητας. Αυτό συμβαίνει όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pI), που στην δικιά μας περίπτωση βρέθηκε στο 3,8 μετά από δοκιμές στη ρύθμιση του pH. Το ισοηλεκτρικό σημείο είναι χαρακτηριστικό για κάθε πρωτεΐνη και εξαρτάται από την σύσταση των αμινοξέων της.

Πιο συγκεκριμένα, η εκχύλιση των πρωτεϊνών στο διάλυμα έγινε με τη ρύθμιση του pH στο 10 με προσθήκη καυστικού νατρίου (NaOH) 10 M. Αυτό γιατί σε pH 10 όλες οι πρωτεΐνες του BSG βρίσκονται σε διαλυτή κατάσταση.

Στη συνέχεια, στο εκχύλισμα πρωτεϊνών έγινε εκ νέου ρύθμιση του pH στο 3,8 με υδροχλωρικό οξύ (HCl) 7% ώστε να γίνει η ισοηλεκτρική κατακρήμνηση τους. Τέλος, οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρωση.



### 2.4.3 Εκχύλιση κυτταρίνης

Με σκοπό την μετατροπή της κυτταρίνης του BSG σε σάκχαρα, πραγματοποιήθηκε όξινη, αλκαλική και ενζυμική υδρόλυση. Πιο συγκεκριμένα, 20 g από το υγρό BSG, αραιώθηκαν σε 68 ml απιονισμένο νερό και ομογενοποιήθηκαν για 15 λεπτά με το ultra turax. Ακολούθησε προσθήκη 2 ml θειικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%) και αποστείρωση για 17 λεπτά. Στη συνέχεια, το υγρό διαχωρίστηκε από το στερεό με διήθηση, το υπερκείμενο κρατήθηκε για ανάλυση HPLC, ενώ το στερεό ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό έως ότου το pH να ουδετεροποιηθεί.

Η απομάκρυνση της λιγνίνης από το στερεό έγινε με αλκαλική υδρόλυση. Το στερεό αραιώθηκε σε 42,5 ml απιονισμένο νερό και προστέθηκαν σε αυτό 2,5 ml καυστικό νάτριο (NaOH 10 M). Η υδρόλυση ολοκληρώθηκε με αποστείρωση διάρκειας 90 λεπτών, ακολούθησε διήθηση και ξέπλυμα του στερεού για ρύθμιση του pH κοντά στο 7.

Τέλος, η κυτταρίνη που παρέμεινε στο στερεό διασπάστηκε σε σάκχαρα με ενζυμική υδρόλυση. Το στερεό τοποθετήθηκε σε κιτρικό buffer (κιτρικό νάτριο 50 mM – κιτρικό οξύ 1 M) με pH 4,8 μαζί με 54 μL από το ένζυμο Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 26921. Η υδρόλυση διήρκησε 96 ώρες σε θερμοκρασία 45°C.

### 2.4.4 Ισοζύγιο μάζας BSG

100 g νωπού BSG αναμείχθηκαν με διάλυμα οξινισμένης αιθανόλης με αραιώση 1:40 w/v, με αποτέλεσμα την εκχύλιση των φαινολικών. Η ποσότητα του HCl ήταν ανάλογη της ρύθμισης του pH των δειγμάτων, ώστε οι πρωτεΐνες στο BSG να βρίσκονται στο ισοηλεκτρικό τους σημείο, δηλαδή στο ίζημα και όχι στο υγρό εκχυλίσματος μαζί με τα φαινολικά συστατικά. Η εκχύλιση ολοκληρώθηκε στους υπερήχους για 30 λεπτά και το υπερκείμενο διαχωρίστηκε με διήθηση από το στερεό. Το υπερκείμενο, με όγκο 430 ml, εξατμίστηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη, η οποία ξαναζυγίστηκε στο τέλος της εξάτμισης για τον υπολογισμό των στερεών υπολειμμάτων σε αυτήν. Τα στερεά διαλύθηκαν σε 10 ml μεθανόλης και υπολογίστηκε η σύσταση σε φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Στο ίζημα μετά την εκχύλιση των φαινολικών ακολούθησε εκχύλιση πρωτεϊνών. Σε αυτό προστέθηκε 5% νερό και ρυθμίστηκε το pH στο 10 με NaOH 10 M, ώστε να εκχυλιστούν οι πρωτεΐνες. Το pH του εκχυλίσματος ρυθμίστηκε εκ νέου στο 3,8 με HCl 7% για να κατακρημνισθούν οι πρωτεΐνες, οι οποίες συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση.

Στο στερεό που έμεινε έγινε όξινη, αλκαλική και ενζυμική υδρόλυση.

## 2.5 Ζύμωση

### 2.5.1 Προκαλλιέργεια

Η προετοιμασία της προκαλλιέργειας παραγματοποιήθηκε σε στείρες συνθήκες, στο θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow). Αρχικά, παρασκευάστηκε θρεπτικό υλικό σε κωνική φιάλη των 250 ml που περιείχε 4g/L σακχαρόζη, 10 g/L γλυκόζη, 0,4 g/L ξυλόζη και 1,5 g/L αραβινόζη σε τελικό όγκο 200 ml, το οποίο αποστειρώθηκε. Στη συνέχεια, η ζύμη, που ήταν αποθηκευμένη διάλυμα γλυκερόλης σε cryovial στους -80 °C, εμβολιάστηκε στο θρεπτικό και επώαστηκε. Η επώαση έγινε μέχρι τη λογαριθμική φάση της ζύμης, στους 30 °C, υπό ανάδευση στις 180 rpm, για 3-4 ημέρες.



Εικόνα 2.4 Αριστερά: Θάλαμος νηματικής ροής Δεξιά: Επωαστήρες ζύμωσης

### 2.5.2 Παρασκευή υποστρώματος

Είναι απαραίτητο το υπόστρωμα που θα παρασκευαστεί, προκειμένου να είναι επιτυχημένη η καλλιέργεια της ζύμης, να περιέχει πηγή άνθρακα, αζώτου και οργανικών ή ανόργανων αλάτων και ιχνοστοιχεία στα συστατικά του. Κύριο συστατικό του υποστρώματος ήταν το BSG αφού είχε υποστεί όξινη, αλκαλική και ενζυμική υδρόλυση με σκοπό η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη που περιέχει να διασπαστεί σε απλούστερα σάκχαρα. Στη συνέχεια, το υδρόλυμα συμπυκνώθηκε. Η συνολική συγκέντρωση των σακχάρων που περιείχε

ήταν 15,71 g/L. Ακόμα ετοιμάστηκε μίγμα αλάτων που περιείχε 11,7 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/L  $\text{NaCl}$ , 1 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,04 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,044 g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  και 0,016 g/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 6 g/L εκχύλισμα ζύμης και 10 g/L corn steep liquor. Επιπλέον, επειδή η ζύμωση θα ήταν fed-batch, παρασκευάστηκε διάλυμα σακχάρων με 400 g/L σακχαρόζη, 100 g/L γλυκόζη και 230 g/L ξυλόζη. Ήταν απαραίτητο όλα τα παραπάνω να αποστειρωθούν, ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση της καλλιέργειας κατά τη ζύμωση. Τέλος, παρασκευάστηκαν και αποστειρώθηκαν 5 M NaOH και 1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  που χρησιμοποιήθηκαν για τη ρύθμιση του pH της ζύμωσης.

### 2.5.3 Ζύμωση

Σκόπος της ζύμωσης ήταν η παραγωγή μικροβιακού λίπους με τη ζύμη *Lipomyces starkeyi*. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα με σύστημα ημι-συνεχές (fed-batch). Αρχικά, ο βιοαντιδραστήρας πληρώθηκε με το υδρόλυμα του BSG και στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτό το εκχύλισμα ζύμης, το corn steep liquor και το μίγμα αλάτων. Τέλος, το υπόστρωμα αυτό εμβολιάστηκε με τη ζύμη και ρυθμίστηκαν οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πήρε μέρος η ζύμωση. Το pH ρυθμίστηκε στο 6, η θερμοκρασία λειτουργίας στους 30 °C, ο ρυθμός ανάδευσης στις 150-500 rpm, το διαλυτό οξυγόνο στο 20% και ο ρυθμός παροχής αέρα στο 1 vvm.

Σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης συλλέγονταν τακτικά δείγματα από τον βιοαντιδραστήρα, στα οποία γινόταν ανάλυση HPLC, από την οποία προέκυπτε ο ρυθμός κατανάλωσης σακχάρων από τη ζύμη, μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD) στα 660 nm και υπολογισμός του ξηρού βάρους της βιομάζας, μετά από ξήρανση. Με βάση την ανάλυση HPLC, όποτε κρινόταν αναγκαίο γινόταν τροφοδοσία της ζύμωσης με 20 ml από το διάλυμα σακχάρων. Πριν από κάθε τροφοδοσία, γινόταν λήψη ενός μεγαλύτερου δείγματος στο οποίο διαχωριζόταν η βιομάζα μετά από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C και στις 9000 στροφές. Η βιομάζα αυτή, στη συνέχεια, μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα φιαλίδια και τοποθετήθηκε στο φούρνο στους  $70 \pm 5$  °C προς ξήρανση και ζυγίστηκε. Στην ξηρή βιομάζα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση και ποσοτική ανάλυση του λίπους.

## 2.5.4 Εκχύλιση λίπους

Αρχικά, η βιομάζα μεταφέρεται σε φιαλίδια McCartney και θρυμματίζεται ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής με τον διαλύτη. Τα λιπίδια εμφανίζονται σε ιστούς σε ποικίλες μορφές, αλλά τα σύνθετα λιπίδια είναι συνήθως συστατικά μεμβρανών, όπου εμφανίζονται σε στενή σύνδεση με ενώσεις όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες με τις οποίες αλληλεπιδρούν με δυνάμεις υδρόφοβες και van der Waals και ίσως με ιοντικούς δεσμούς. Διάφοροι διαλύτες ή συνδυασμοί αυτών έχουν προταθεί ως εκχυλιστικοί με πιο γνωστό τον συνδυασμό χλωροφόρμιο-μεθανόλη σε αναλογία 2:1 κατ'όγκο όπως προτείνεται από τους Folch et al. (1957). Το ενδογενές νερό του ιστού είναι ένα τρίτο στοιχείο του συστήματος. Στο φιαλίδιο McCartney με τη βιομάζα προστίθεται ο διαλύτης και τοποθετείται στο σκοτάδι για 5 ημέρες, για να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών οξέων του λίπους. Το μίγμα χωρίζεται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων το κατώτερο αποτελείται από χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό σε αναλογία 86:14:1 κατ'όγκο και περιέχει σχεδόν όλα τα λιπίδια, ενώ η πάνω φάση αποτελείται από τους ίδιους διαλύτες σε αναλογία 3:48:47 κατ'όγκο, αντίστοιχα, και περιέχει μη λιπαρά συστατικά. Μετά το πέρας των 5 ημερών, γίνεται διαχωρισμός του εκχυλίσματος από το στερεό με διήθηση. Το εκχύλισμα μεταφέρεται, στη συνέχεια, σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης και ακολουθεί εξάτμιση στον περιστροφικό εξάτμιστήρα για την απομάκρυνση των διαλυτών. Μετά την εξάτμιση, η φιάλη ζυγίζεται και υπολογίζεται το βάρος του μικροβιακού λίπους σε g/L καλλιέργειας.

## 2.5.5 Μετεστεροποίηση λιπαρών οξέων

Η μετεστεροποίηση είναι η διαδικασία μετατροπής των λιπαρών οξέων σε μεθυλέστερες λιπαρών οξέων (FAME). Από χημική σκοπία στη διαδικασία αυτή γίνεται ανταλλαγή της ομάδας R'' ενός εστέρα με την ομάδα R' μιας αλκοόλης, ενώ αυτή η αντίδραση καταλύεται όξινα ή αλκαλικά, όπως στο σχήμα.



Εικόνα 2.5 Αντίδραση μετεστεροποίησης

Τα ισχυρά οξέα καταλύουν την αντίδραση προσφέροντας ένα πρωτόνιο στην ομάδα καρβονυλίου, καθιστώντας το έτσι πιο ισχυρό ηλεκτρόφιλο, ενώ οι βάσεις καταλύουν την αντίδραση αφαιρώντας ένα πρωτόνιο από την αλκοόλη, καθιστώντας την έτσι πιο πυρηνόφιλο.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση η μετεστεροποίηση είναι όξινη. Πιο συγκεκριμένα, στην φιάλη εξάτμισης που περιέχει το λίπος, προστίθενται αρχικά 10 ml μεθανολικού νατρίου (MeONa) και τοποθετείται σε θερμαντικό μανδύα για βρασμό για 20 λεπτά. Ρόλος του μεθανολικού νατρίου είναι η μεθανόλυση των γλυκεριδίων. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη υδροχλωρικής μεθανόλης (υδροχλωρικό οξύ σε μεθανόλη) μέχρι το διάλυμα να αποχρωματιστεί και ακολουθεί νέος βρασμός για 20 λεπτά. Σε αυτή τη φάση, τα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται με τη μεθανόλη, παρουσία του υδροχλωρίου. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, γίνεται προσθήκη νερού με σκοπό να λάβει τέλος η αντίδραση, ενώ το διάλυμα αποκτά γαλακτερό χρώμα. Επείτα, το διάλυμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και προστίθενται 6 ml εξανίου με σκοπό να σχηματίζονται 2 φάσεις. Στη φάση με τον μη πολικό διαλύτη, δηλαδή το εξάνιο, βρίσκονται οι μεθυλεστέρες, ενώ στην υδατική φάση, η γλυκερόλη. Τέλος, η φάση με τους μεθυλεστέρες μεταφέρεται σε vials, τα οποία περιέχουν μικρή ποσότητα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  το οποίο συγκρατεί ποσότητα νερού που μπορεί να έχει απομείνει.

### 2.5.6 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους έγινε με αέρια χρωματογραφία (GC). Η αέρια χρωματογραφία είναι μια χημική ανάλυση για τον διαχωρισμό χημικών ενός πολύπλοκου δείγματος. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται μέσω εκλεκτικών προσροφήσεων μεταξύ μιας αερίως κινούμενης φάσης, στη συγκεκριμένη περίπτωση Ήλιο, και μιας στερεάς ή υγρής στατικής φάσης μέσα στη στήλη της χρωματογραφίας. Καθώς οι χημικές ουσίες εξέρχονται από το τέλος της στήλης, ανιχνεύονται και αναγνωρίζονται ηλεκτρονικά. Ο ρόλος της στατικής φάσης στη στήλη είναι ο διαχωρισμός διαφορετικών συστατικών, κάνοντας το καθένα να εξέλθει από τη στήλη σε διαφορετικό χρόνο. Σε μια ανάλυση GC, συγκεκριμένος όγκος αερίου ή υγρού αναλύτη (συνήθως 1  $\mu\text{L}$ ) εισάγεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής στην κορυφή της στήλης. Καθώς το φέρον αέριο συμπαρασέρνει τα μόρια της προς ανάλυση ουσίας, αυτή η κίνηση αναστέλλεται από την προσρόφηση των μορίων του αναλύτη είτε στα τοιχώματα της στήλης, είτε στα υλικά συσκευασίας της. Δεδομένου ότι κάθε τύπος μορίου έχει διαφορετικό ρυθμό μετάβασης, τα διάφορα συστατικά της αναλυόμενης ουσίας διαχωρίζονται καθώς προχωρούν κατά μήκος της στήλης και φτάνουν στο τέλος της στήλης (έκλυση) σε διαφορετικούς χρόνους. Για την

παρακολούθηση της ροής εξόδου από τη στήλη χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτής FID, επομένως μπορεί να προσδιοριστεί ο χρόνος με τον οποίο κάθε συστατικό φτάνει στην έξοδο και η ποσότητα αυτού.

Για την ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος Fisons GC8000, με στήλη χρωματογραφίας DB-23 διαστάσεων 60 m x 0,25 mm. Η πίεση φέροντος αερίου ήταν ρυθμισμένη στα 250 kPa και ροή του στα 2,6 ml/min.

Στην αέρια χρωματογραφία, ο διαχωρισμός εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν στους 250 °C και του ανιχνευτή στους 270 °C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ρυθμίστηκε ως εξής: στους 45 °C για 5 λεπτά, από τους 5 °C μέχρι τους 150 °C και παραμονή για 5 λεπτά, στους 7 °C μέχρι τους 220 °C και παραμονή για 20 λεπτά.

Ο προσδιορισμός των άγνωστων μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων γίνεται συγκρίνοντας τους χρόνους απόκρισής τους με αυτούς των πρότυπων μεθυλεστέρων. Η έκλυση των μεθυλεστέρων από τη στήλη γίνεται ξεκινώντας από αυτόν που έχει τον μικρότερο αριθμό ατόμων, ενώ ο χρόνος κατακράτησης αυξάνεται όταν αυξάνεται και ο αριθμός των διπλών δεσμών στα λιπαρά οξέα.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **3.1 Αποτελέσματα σύστασης BSG**

Η υγρασία του BSG υπολογίστηκε σε ποσοστό 53,4%, ενώ ο ανόργανος φωσφόρος και το άζωτο των ελεύθερων αμινοξέων από το υπερκείμενο της διάλυσης του αποβλήτου σε νερό βρέθηκαν 10,848 mg/100 ξηρού και 5,253 mg/100 ξηρού αντίστοιχα. Όσον αφορά στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη αυτή υπολογίστηκε σε ξηρό BSG με τη μέθοδο Kjeldahl στο 23%. Το pH του BSG αραιωμένο σε νερό ήταν 6,66.

Τα υδατοδιαλυτά συστατικά, με τη μέθοδο Soxhlet με διαλύτη το νερό βρέθηκαν 0,647 g στη μία σφαιρική και 0,558 g στην δεύτερη, ενώ τα οργανικά διαλυτά με διαλύτη την αιθανόλη υπολογίστηκαν 0,741 g στη μία και 0,834 στην δεύτερη.

Ακόμα στα εκχύλισμα από τη μέθοδο Soxhlet έγινε προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου και αζώτου ελεύθερων αμινοξέων. Συγκεκριμένα, στο εκχύλισμα της Soxhlet με διαλύτη το νερό, ο ανόργανος φωσφόρος βρέθηκε 4,9 mg/100 g ξηρού, ενώ το άζωτο των ελεύθερων αμινοξέων βρέθηκε 1,018.

Αντίστοιχα, στο εκχύλισμα από τη μέθοδο Soxhlet με διαλύτη την αιθανόλη, τα μεγέθη ήταν 18,932 mg/100 g ξηρού και 3,215 mg/100 g ξηρού.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό λίπους, αυτό βρέθηκε 0,07% επί ξηρού.

Με τη μέθοδο της NREL προσδιορίστηκε η σύσταση σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη, και τέφρα. Το όξινο αδιάλυτο στερεό υπόλειμμα βρέθηκε ίσο με 19,933 % ξηρού βάρους. Η όξινη αδιάλυτη και διαλυτή λιγνίνη υπολογίστηκαν αντίστοιχα 37,733 και 0,71 % ξηρού βάρους, που στο σύνολο τους, 38,439 % αποτελούν τη λιγνίνη. Η κυτταρίνη εκφρασμένη σε β-γλυκάνη και η ημικυτταρίνη εκφρασμένη με το άθροισμα της ξυλάνης, της γαλακτάνης, της μαννάνης και αραβινάνης βρέθηκαν αντίστοιχα 19,17 και 44,46 και τέλος η τέφρα 0,006 % ξηρού βάρους.

**Πίνακας 3.1** Αποτελέσματα σύστασης BSG

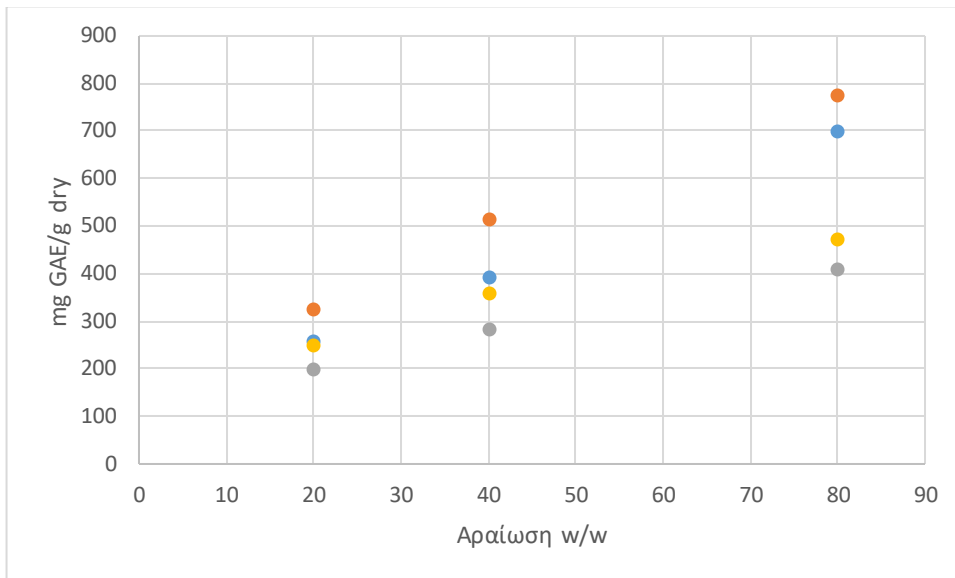
	Παρούσα μελέτη	Άλλες μελέτες
pH	6,66	5,41
Υγρασία (%)	53,4	77-81
Λιγνίνη (% Ξηρό βάρος)	38,439	7-8
Τέφρα (% Ξηρό βάρος )	0,006	2,4
Πρωτεΐνη (% Ξηρό βάρος)	23,1	24
Λίπος (% Ξηρό βάρος )	0,07	2,5
Κυτταρίνη (% Ξηρό βάρος )	19,17	16,8 - 25,4
Ημικυτταρίνη (% Ξηρό βάρος )	44,46	28,4

Η εκχύλιση των φαινολικών έγινε αρχικά σε υγρό BSG μη πολτοποιημένο με διαλύτες αιθανόλη, οξινισμένη αιθανόλη, ακετόνη και οξινισμένη ακετόνη σε αραιώσεις 1:20, 1:40 και 1:80. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρες υπό ανάδευση για 2 ώρες. Στο εκχύλισμα που προέκυψε, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 3.2** συγκέντρωση φαινολικων συστατικων στο BSG με χρήση επωαστήρα υπό ανάδευση.

Αραίωση (w/v)	Διαλύτης	Φαινολικά συστατικά (mg GAE/ 100 g ξηρό)
1:20	Ακετόνη	257,89
	Ακετόνη-HCl	323,02
	Αιθανόλη	197,62
	Αιθανόλη-HCl	246,23
1:40	Ακετόνη	391,36
	Ακετόνη-HCl	511,9
	Αιθανόλη	280,54
	Αιθανόλη-HCl	356,36
1:80	Ακετόνη	697,17
	Ακετόνη-HCl	774,94
	Αιθανόλη	409,93
	Αιθανόλη-HCl	471,65



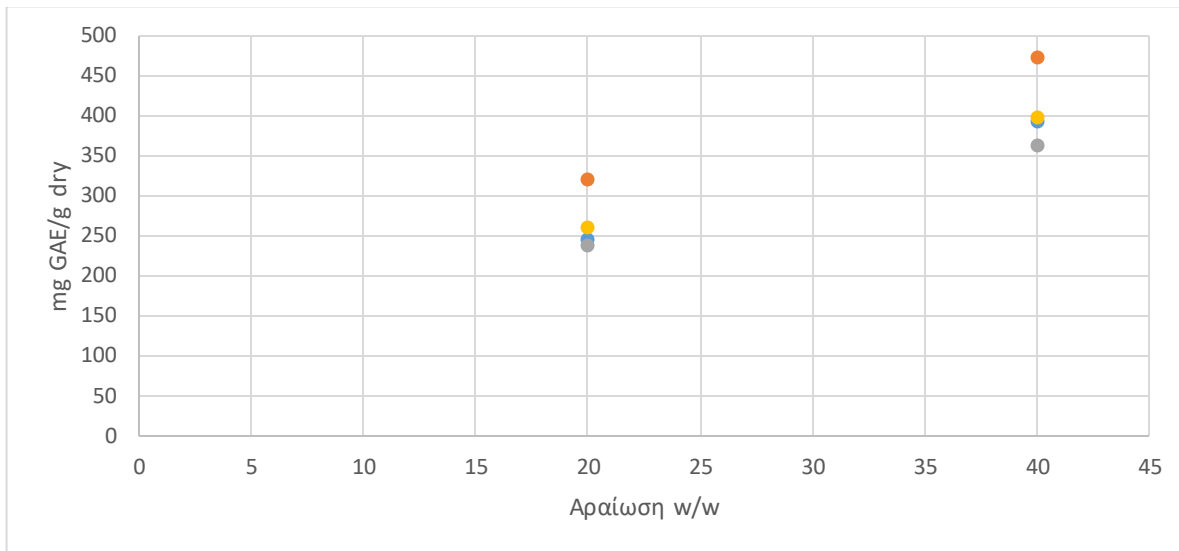


**Γράφημα 3.1** Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών έναντι της αραίωσης σε διαλύτη αιθανόλη (γκρι), αιθανόλη-HCl (κίτρινο), ακετόνη (μπλε), ακετόνη-HCl (πορτοκαλί)

Στη συνέχεια, ακολούθησε η ίδια διαδικασία, αυτή τη φορά σε πολτοποιημένο BSG με αραιώσεις 1:20 και 1:40.

**Πίνακας 3.3** συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε πολτοποιημένο BSG με χρήση επωαστήρα υπό ανάδευση.

Αραίωση (w/v)	Διαλύτης	Φαινολικά συστατικά (mg GAE/ 100 g ξηρό)
1:20	Αιθανόλη	245,26
	Αιθανόλη-HCl	321,08
	Ακετόνη	237,48
	Ακετόνη-HCl	258,87
1:40	Αιθανόλη	393,3
	Αιθανόλη-HCl	473,02
	Ακετόνη	362,2
	Ακετόνη-HCl	397,19

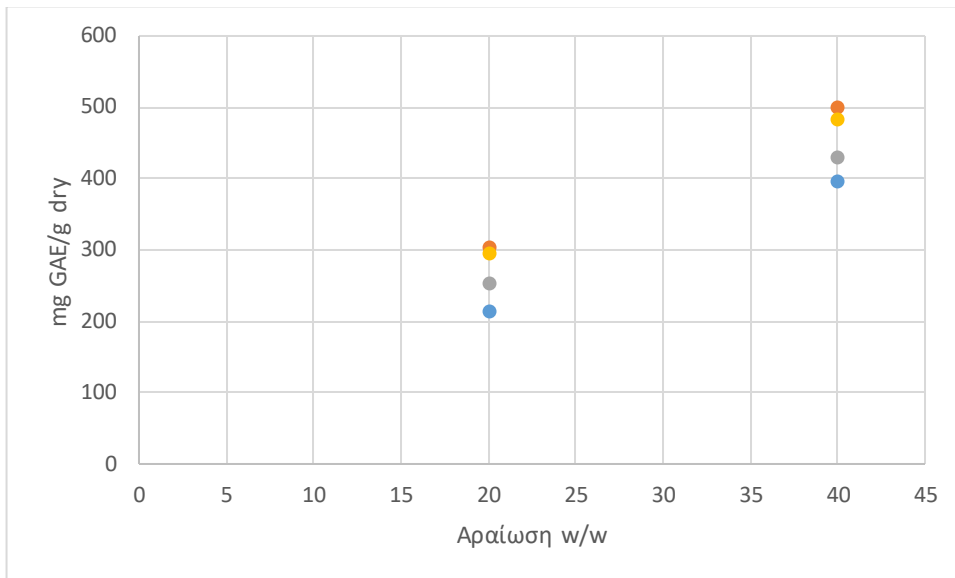


**Γράφημα 3.2** Συγκεντρώσεις φαιολικών συστατικών έναντι της αραίωσης σε διαλύτη αιθανόλη (μπλε), αιθανόλη-HCl (πορτοκαλί), ακετόνη (γκρι), ακετόνη-HCl (κίτρινο)

Τέλος, προσδιορισμός φαιολικών έγινε και σε πολτοποιημένο BSG, σε αραιώσεις 1:20 και 1:40, αυτή τη φορά με χρήση υπερήχων για 30 λεπτά.

**Πίνακας 3.4** συγκέντρωση φαιολικών συστατικών σε πολτοποιημένο BSG με χρήση υπερήχων.

1:20	Ethanol	212,21
	Αιθανόλη-HCl	301,64
	Ακετόνη	251,09
	Ακετόνη-HCl	293,86
1:40	Αιθανόλη	395,25
	Αιθανόλη-HCl	498,29
	Ακετόνη	428,3
	Ακετόνη-HCl	482,74



**Γράφημα 3.3** Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών έναντι της αραίωσης σε διαλύτη αιθανόλη (μπλε), αιθανόλη-HCl (πορτοκαλί), ακετόνη (γκρι), ακετόνη-HCl (κίτρινο)

## 3.2 Ισοζύγια μάζας BSG

### 3.2.1 Εκχύλιση φαινολικών

Από τα 100 g υγρού BSG τα 47,52 g είναι το ξηρό, ενώ τα 52,48 g το νερό. Μετά την εκχύλιση των φαινολικών με EtOH-HCl σε αραίωση 1:40 και χρήση υπερήχων, το υπερκείμενο εξατμίστηκε, το στερεό υπόλειμμα αραιώθηκε σε 10 ml MeOH και προσδιορίστηκε η σύσταση σε φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu, η οποία βρέθηκε 498 mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Σε αυτή την περίπτωση η επιλογή της αιθανόλης έγινε για να σπάσουν τα κυτταρικά τοιχώματα και να λάβει μέρος η εκχύλιση, καθώς και γιατί θεωρείται πράσινος διαλύτης.

### 3.2.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών

Στο στερεό που προέκυψε από την εκχύλιση φαινολικών έγινε διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Ο διαχωρισμός έγινε με κατακρήμνιση τους, ρυθμίζοντας το pH στο 3,8, η τιμή του οποίου οφείλεται στην παρουσία του γλουταμινικού οξέος στα αμινοξέα. Από αυτές ανακτήθηκε το 60% της αρχικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη.

### 3.2.3 Υδρόλυση

Ακολούθησε χημική υδρόλυση με θειικό οξύ και καυστικό νάτριο στο στερεό από την εκχύλιση πρωτεϊνών. Με την προσθήκη θειικού οξέος πραγματοποιήθηκε διάσπαση της

ημικυτταρίνης σε ξύλοζη, μαννόζη, γαλακτοζη και αραβινοζη, ενώ με την προσθήκη καυστικού νατρίου έγινε απομάκρυνση της λιγνίνης.

Από το στάδιο της όξινης υδρόλυσης το υπερκείμενο υποβλήθηκε σε ανάλυση HPLC και τα συνολικά σάκχαρα βρέθηκαν 32,28 g/L.

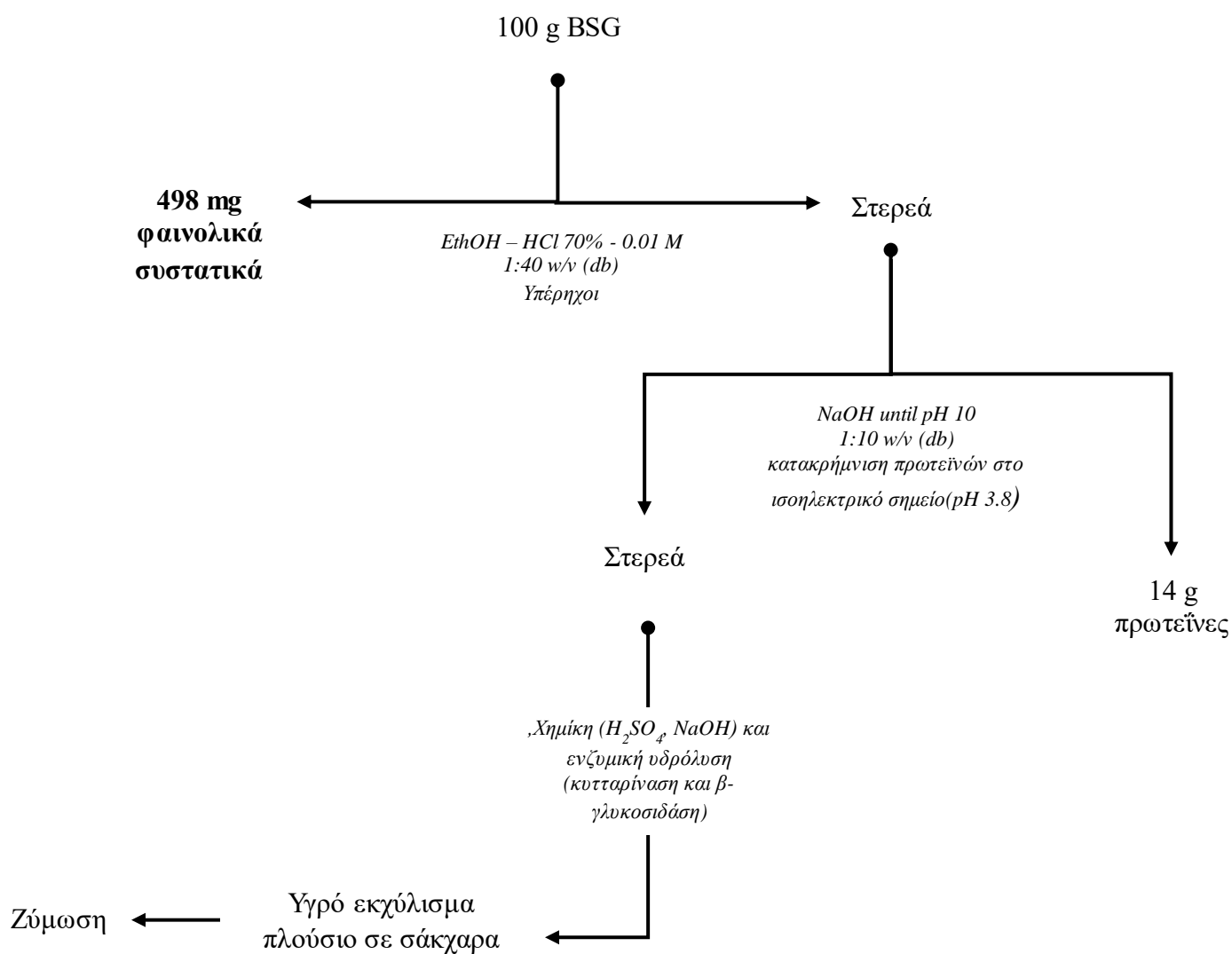
**Πίνακας 3.5** συγκεντρώσεις σακχάρων σε g/L και g/g ξηρού στο εκχύλισμα από την όξινη υδρόλυση

	Σακχαρόζη	Γλυκόζη	Ξυλόζη	Αραβινοζη	Σύνολο
g/L	1,28	2,86	17,38	10,76	32,28

Τέλος, στο προηγούμενο στερεό έγινε ενζυμική υδρόλυση, με κυτταρίναση και β-γλυκοσιδάση με αποτέλεσμα την διάσπαση της κυτταρίνης σε απλούστερα σάκχαρα, στο τέλος της οποίας προέκυψε υπερκείμενο υγρό στο οποίο μετά από ανάλυση HPLC βρέθηκαν σάκχαρα συνολικής συγκέντρωσης 16,42 g/L.

**Πίνακας 3.6** συγκεντρώσεις σακχάρων σε g/L και g/g ξηρού στο εκχύλισμα από την βασική υδρόλυση

	Σακχαρόζη	Γλυκόζη	Ξυλόζη	Αραβινοζη	Σύνολο
g/L	8,3	7,3	0,66	0,19	16,42



Γράφημα 3.4 Διάγραμμα διαδικασίας ισοζυγίου μάζας

### 3.3 Ζύμωση

Η καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* στο υδρόλυμα από το BSG διήρκεσε 9 ημέρες. 3-4 φορές την ημέρα γινόταν λήψη δείγματος, η ανάλυση του οποίου στην HPLC έδειχνε τον ρυθμό κατανάλωσης των σακχάρων από τη ζύμη. Ακόμα, στα σημεία που η

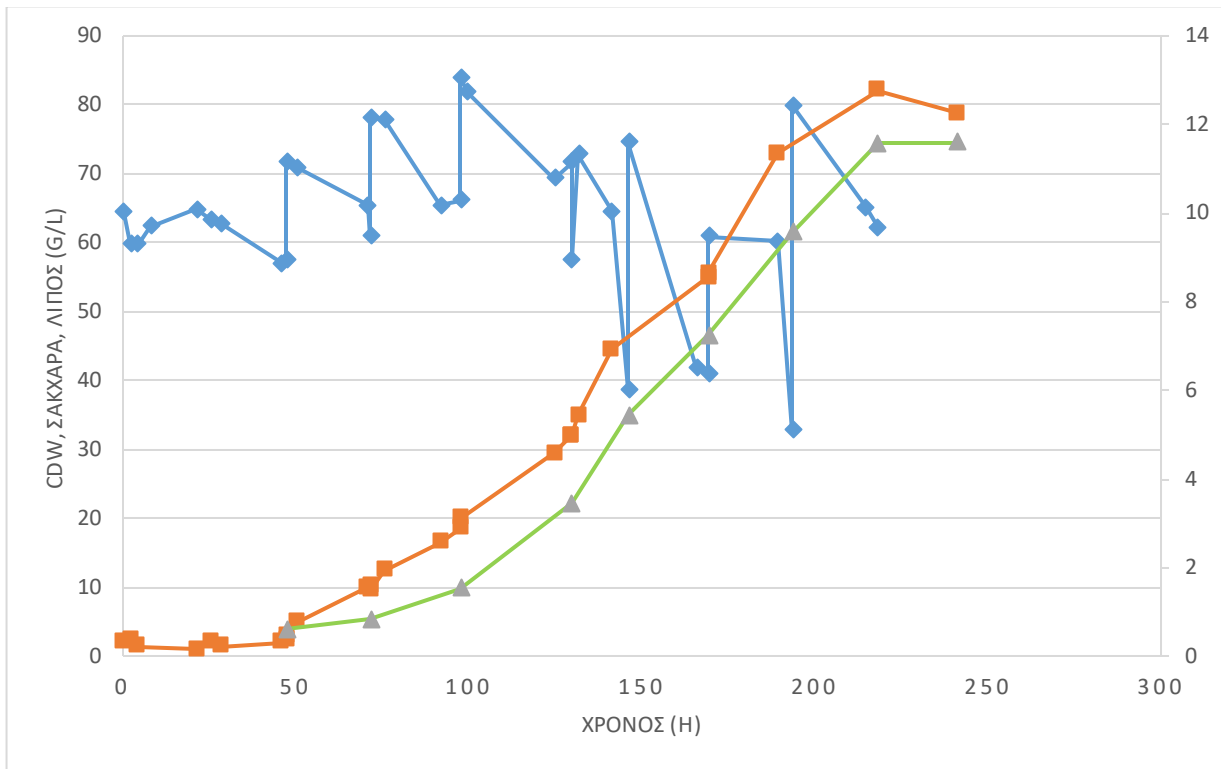
γλυκόζη καταναλωνόταν όλη ή σχεδόν όλη γινόταν τροφοδοσία του μέσου με εμπορικά σάκχαρα. Οι συγκεντρώσεις των σακχάρων έναντι του χρόνου φαίνονται στο παρακάτω γράφημα.

Παράλληλα, γινόταν και υπολογισμός του ξηρού βάρους των κυττάρων από τα δείγματα που λαμβάνονταν.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η συγκέντρωση των κυττάρων αυξήθηκε με αυτόν τον ρυθμό τροφοδοσίας, μέχρι το τέλος της ζύμωσης (218 h) και έφτασε τα 82,1 g/L. Η περιεκτικότητα σε λίπος αυξήθηκε από 15,125% σε 17,489% (w/w), δείχνοντας πως η ζύμη χρησιμοποίησε τα θρεπτικά συστατικά ως επί το πλείστον για ανάπτυξη και συντήρηση, ευνοώντας έτσι την κυτταρική ανάπτυξη έναντι της συσσώρευσης λίπους. Το υψηλότερο  $Y_{P/S}$  επιτεύχθηκε στο τέλος της ζύμωσης (0,652 g/g). Γενικά, οι μικροοργανισμοί όταν αναπτύσσονται σε ένα μίγμα σακχάρων, μεταβολίζουν τα σάκχαρα διαδοχικά, επειδή η γλυκόζη εμποδίζει την χρησιμοποίηση άλλων σακχάρων μέσω ενός μηχανισμού καταστολής ή αλλοστερικού ανταγωνισμού για τους μεταφορείς των σακχάρων (Kawaguchi et al., 2006). Σε αυτή τη μελέτη, τα σάκχαρα καταναλώνονταν διαδοχικά, με πρώτη την γλυκόζη και ακολουθούσε η ξυλόζη, ενώ η αραβινόζη έμενε σταθερή. Το συνολικό  $Y_{P/S}$  βρέθηκε ίσο με 0,083 g/g, ενώ το συνολικό  $Y_{X/S}$  ίσο με 0,561 g/g.

**Πίνακας 3.7** Αναγράφεται το ξηρό βάρος και ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων, η συγκέντρωση, ο ρυθμός παραγωγής και η περιεκτικότητα του λίπους και η απόδοση παραγωγής βιομάζας και λίπους έναντι των σακχάρων σε κάθε χρονική στιγμή τροφοδοσίας του βιοαντιδραστήρα

Χρόνος (h)	47	71,5	97,5	129,5	146	169	193,5	218
CDW (g/L)	4	10,1	18,6	32,1	45	55	73	82,1
Παραγωγικότητα βιομάζας (g/L h)	0,085	0,141	0,191	0,248	0,308	0,325	0,377	0,376
Λίπος (g/L)	0,605	0,835	1,54	3,44	5,43	7,24	9,556	11,56
Παραγωγικότητα λίπους (g/L h)	0,0129	0,0117	0,0158	0,0266	0,0372	0,0428	0,0494	0,0530
Λίπος % (w/w)	15,125	8,267	8,280	13,155	17,238	13,164	16,266	17,489
$Y_{X/S}$ (g CDW/g sugar)	0,578	0,927	1,566	2,584	2,387	1,634	2,602	4,630
$Y_{P/S}$ (g lipid/g sugar)	0,087	0,077	0,130	0,277	0,288	0,215	0,340	0,652



**Γράφημα 3.5** Παραγωγή βιομάζας (πορτοκαλί), λίπους (πράσινο) και κατανάλωση σακχάρων (μπλε), έναντι του χρόνου

Κατά τις πρώτες 47 ώρες της ζύμωσης δεν παρατηρείται παραγωγή λίπους από τη ζύμη το οποίο οφείλεται στην παρουσία αζώτου στο μέσο. Στη φάση αυτή, αυξάνεται η βιομάζα καθώς καταναλώνεται το υπόστρωμα. Η παραγωγή λίπους αρχίζει μετά τις 47 ώρες με την μέγιστη παραγωγή του να συμβαίνει στις 218, που αντιστοιχεί σε 11,56 g/L.

Στα δείγματα που λήφθηκαν στις ώρες 97,5, 193,5 και 218 έγινε εκχύλιση του λίπους, μεθυλεστεροποίηση του και ανάλυση αέριας χρωματογραφίας. Το μικροβιακό λίπος που παράγει ο *L. starkeyi* περιέχει αλυσίδες με 14-18 άτομα άνθρακα και εμφανίζουν χαμηλό βαθμό ακορεστότητας, το οποίο είναι επιθυμητό όταν εφαρμόζεται στην παραγωγή βιοντίζελ. Αποτελείται κυρίως από παλμιτικό (16:0) και ελαϊκό οξύ (18:1), ενώ σε μικρότερα ποσοστά υπάρχουν και το μυριστικό (14:0), το στεατικό (18:0), το παλμιτολεϊκό (16:1) και το λινελαϊκό οξύ (18:2).

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η σύσταση του λίπους σε λιπαρά οξέα.

**Πίνακας 3.8** Σύσταση σε λιπαρά οξέα

FAMES	%		
	t97,5	t193,5	t218
14:0	0,6%	0,3%	0,3%
16:0	39,1%	38,1%	38,9%
16:1	1,6%	1,2%	1,2%
18:0	8,7%	8,3%	8,4%
18:1	44,4%	48,1%	48,5%
18:2	5,6%	4%	2,6%

Η σύσταση των λιπαρών οξέων ήταν αρκετά παρόμοια με αυτή του φοινικέλαιου από το οποίο παράγονται σημαντικά βιομηχανικά προϊόντα όπως σαπούνια, λοσιόν, μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, εποξειδωμένο φοινικέλαιο. Ακόμα, το λάδι αυτό αποτελεί ένα εξαιρετικό λάδι για τηγάνισμα λόγω των μη κολλωδών και αντιαφριστικών του ιδιοτήτων. Όλα αυτά υποδεικνύουν πως τα λιπίδια που παράγονται από τη ζύμη *L. starkeyi* έχουν μεγάλες δυνατότητες ως πρώτη ύλη για παραγωγή βιοντίζελ και άλλων ελαιοχημικών εφαρμογών. (Anschau et al. 2014)



**Πίνακας 3.9** Σύσταση λιπαρών οξέων από διαφορετικά έλαια

Πηγή λίπους	% FAME					Παραπομπές
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	Άλλα	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	38.9	8.4	48.5	2.6	1.5	Παρούσα μελέτη
Ηλιέλαιο	5-7	3-6	14-40	48-74	-	
Σογιέλαιο	10-12	3-5	18-26	49-57	6-9	Knothe, 2008
Βαμβακέλαιο	22-26	2-3	15-22	47-58	ίχνη	
Κραμβέλαιο	2-5	0-4	51-68	18-25	7-11	
Φοινικέλαιο	39-50	3-5	38-45	8-12	ίχνη	Sargeant et al., 2014
Ζωικό λίπος	24-32	20-25	37-43	2--3	-	
Λαρδί	28-30	12-18	40-50	7--13	0-1	
Κίτρινο λίπος	23.24	12.96	44.32	6.97	0.67	Canakci et al., 2001
Καφέ λίπος	22.83	12.54	42.36	12.09	0.82	

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός και η εξαγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως πρωτεΐνες, αντιοξειδωτικά, λίπος από τα υπολείμματα βύνης που προέρχονται από την διαδικασία της ζυθοποίησης. Επίσης, μετά την εξαγωγή αυτών των προϊόντων, στο υδρόλυμα του στερεού που απέμεινε έγινε καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* με σκοπό την παραγωγή μικροβιακού λίπους

Όσον αφορά την μέθοδο για την εκχύλιση των φαινολικών, επιλέχθηκε σαν καλύτερος διαλύτης η οξινισμένη αιθανόλη σε σχέση με την ακετόνη, οξινισμένη ή μη. Επίσης, σαν καλύτερη αραιώση του διαλύματος επιλέχθηκε η 1:40 σε σχέση με την 1:20 και 1:80. Ο τρόπος εκχύλισης των αντιοξειδωτικών που επιλέχθηκε ήταν το υδατόλουτρο υπερήχων για μισή ώρα αντί του επωαστήρα υπό ανάδευση για 2 ώρες. Τέλος, καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε ξηρό BSG και όχι νωπό. Υπό αυτές τις συνθήκες η μέγιστη σύσταση φαινολικών που προέκυψε ήταν 498,29 mg γαλλικού οξέος/g ξηρού BSG.

Για την εύρεση του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών του BSG έγιναν δοκιμές ρυθμίζοντας κάθε φορά το pH με προσθήκη HCl. Μεταξύ των τιμών pH 4,2, 4, 3,91, 3,8, 3,63, 3,74 αυτό που παρουσίασε την κατακρήμνιση της περισσότερης ποσότητας πρωτεϊνών ήταν το 3,8. Η σχετικά χαμηλή τιμή του ισοηλεκτρικού σημείου για τις πρωτεΐνες του BSG οφείλεται στο γεγονός πως το αμινοξύ που κυριαρχεί είναι το γλουταμινικό οξύ.

### **4.1 Πρώτες ύλες**

Στην παραγωγή βιοντίζελ η πρώτες ύλες αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 70% του συνολικού κόστους. Ένας τρόπος να μειωθεί το κόστος είναι να χρήση υπολειμμάτων βιομάζας, τα βρίσκονται σε αφθονία, ως πρώτη ύλη. Στους ερευνητικούς κύκλους αναπτύχθηκε η άποψη της χρήσης γεωργικών και βιομηχανικών αποβλήτων ως υποστρωμάτων ζύμωσης για παραγωγή μικροβιακού λίπους. Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα, όπως τα γεωργικά απόβλητα, είναι το πλέον άφθονο φυσικό πολυμερές που μπορεί να χρησιμεύσει ως πρώτη ύλη για ζύμωση. Το τοίχωμα των φυτικών κυττάρων αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Η κυτταρίνη είναι το κύριο συστατικό της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας σε ποσοστό 30-50% του βάρους της βιομάζας. Έχει μια μη διακλαδισμένη και γραμμική δομή επαναλαμβανόμενων μονάδων κελοβιόζης (2 γλυκόζες συνδεδεμένες με β-1,4 γλυκοσιδικό δεσμό), εμφανίζοντας έτσι μεγάλο μοριακό βάρος.

Κάποιες γραμμικές αλυσίδες της κυτταρίνης συνδέονται μεταξύ τους με δεμούς υδρογόνου, ομοιοπολικούς δεσμούς ή δεσμούς van der Waals, σχηματίζοντας έτσι μικροϊνες που ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν ίνες κυτταρίνης. Η κυτταρίνη τείνει να τοποθετείται παράλληλα, έχοντας μια κρυσταλλική δομή με λιγότερο άμορφες περιοχές. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν την κυτταρίνη λιγότερο διαλυτή και λιγότερο αποικοδομήσιμη. Το δεύτερο συστατικό σε σύσταση στη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα είναι η ημικυτταρίνη με περίπου 14-30% του βάρους της βιομάζας. Είναι γραμμικά πολυμερές με διακλαδώσεις, έχει χαμηλότερο μοριακό βάρος από την κυτταρίνη και αποτελείται από εξόζες, πεντόζες και ακετυλιωμένα σάκχαρα. Τέλος, η λιγνίνη αποτελεί το 5-20% του βάρους της βιομάζας. Είναι ένα άμορφο ετεροπολυμερές και ένα πολύπλοκο μόριο που είναι εξαιρετικά ανθεκτικό σε χημική και ενζυμική αποικοδόμηση, καθιστώντας το δομικό στήριγμα της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας.

Η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη είναι οι κυριότερες πηγές σακχάρων από λιγνοκυτταρινούχες βιομάζες. Η ημικυτταρίνη είναι το πιο θερμοχημικά ευαίσθητο μέρος της βιομάζας. Είναι απαραίτητη η προεργασία της βιομάζας για να δώσει τα σάκχαρα που θα καταναλώσει η ελαιογόνος ζύμη για να παράξει λίπος και αυτό γιατί οι ζύμες δεν έχουν κυτταρολυτική δράση. Η προεργασία αυτή χρειάζεται για να διαχωριστούν τα πολυμερή και να μπορέσει να πάρει μέρος η υδρόλυση.

Σύμφωνα με τον Balan (2014), η διαδικασία προεργασίας, όταν σκοπός είναι η εμπορική εκμετάλλευση, πρέπει να ικανοποιεί κάποια κριτήρια: να μπορεί να διαχωριστεί η λιγνίνη, ώστε να βελτιωθεί η μακροπρόθεσμη συντήρηση της βιομάζας, να χρησιμοποιούνται φτηνά και ακίνδυνα χημικά και λιγότερη ενέργεια, να παράγονται λιγότεροι αναστολείς, να υπάρχει πιθανότητα διατήρησης της λιγνίνης και να είναι δυνατή η ανάκτηση χρησιμοποιημένων καταλυτών.

Έχουν μελετηθεί διαφορετικά είδη πρώτης ύλης για την καλλιέργεια του *L. starkeyi*. Η ζύμη αυτή είναι σε θέση να καταναλώνει ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.1. Επιπλέον, είναι ικανή να καταναλώσει ορό γάλακτος, ζιζανιοκτόνα και παρακουάτ, δεν μπορεί όμως να αφομοιώσει 1,2-προπανοδιόλη καταναλώνοντας αντί αυτής το δικό του λίπος. Η μελέτη των Liu et al. (2011) έδειξε πως ο *L. Starkeyi* ήταν σε θέση να αναπτυχθεί καλά (30 g/L), με περιεκτικότητα σε λίπος 46% μετά από 96 ώρες καλλιέργειας.

**Πίνακας 4.1** Υποστρώματα που μπορεί να καταναλώσει ο *Lipomyces starkeyi*

Στέλεχος	Υποστρώματα	Σύστημα α	CDW (g/L)	Σύσταση λίπους (% w/w)	Παραγωγικότητ α λίπους (g/L day)	Conversion (g oil/g sugar)	Optimum condition	Παραπομπές
AS 2.1560	Γλυκόζη	B	30	46	3.45	0.20	C/N 133	Liu et al., 2011
	Γλυκόζη	f	–	35	–	–		
IAM 4753	Γλυκόζη	f	–	10	–	ND		Naganuma et al., 1985
DSM70295	Γλυκόζη	f	9.4	68	0.8	ND	C/N 150	Angerbauer et al., 2008
AS 2.1560	Γλυκόζη & Ξυλόζη	f	20.5	61.5	2.52	ND	G:X 2:1	Zhao et al., 2008
2.1608	Γλυκόζη	f	9.35	21.8	ND	0.11		Chen et al., 2009
2.1390		f	6.16	37.2	ND	0.11		
NRRLY-11557	Γλυκόζη	f	11.7	30	1.68	0.1	C/N 61.2	Wild et al., 2010
	Άμυλο πατάτας	B	10	40.3	1.93	0.16		
ATCC 12659	Υδρόλυμα άχρuru σίτου	f	14.7	31.2	0.76	ND	Nondetoxified	Yu et al., 2011
AS 2.1560	Γλυκόζη	f	13.3	62.4	0.23	0.24	48 h ino	Lin et al., 2011
		FBB	104.6	64.9	ND	ND	2-staged	
NRRL Y-11557	Σιρόπι γλυκόζης	f	8.5	16.47	ND	0.04	As C source	El-Naggar, Noura El-Ahmady Ali et al., 2011
CBS 1807	D- Ξυλόζη	f	12.5	80	0.83	ND	C <sub>initial</sub> 100 g/L	Oguri et al., 2012
AS 2.1560	Κελοβιόζη, Ξυλόζη, Γλυκόζη	f	25.5	52	2.95	0.2	C <sup>40</sup> X <sup>20</sup> G <sup>10</sup>	Gong et al., 2012
DSM70296	Ξυλόζη	f	12.32	35.02	0.65	0.14	C/N 50	Tapia et al., 2012
	Γλυκόζη - Ξυλόζη	FBB	76	43.85	ND	0.19	C/N 50, G <sup>30</sup> X <sup>70</sup>	
GIM 2.142	Άμυλο πατάτας απόνερα + Γλυκόζη	f	2.59	8.8	0.06	ND	Glucose & ammonium sulfate added	Liu et al., 2013
UCDFST 78–23	Γλυκόζη	f	2	25.3	0.51			Sitepu et al., 2013
–	Υδρόλυμα άχρuru ρυζιού	f	12.76	35.65	1.52	0.18		Azad et al., 2014
ATCC 56304	Ξυλόζη	FBB	27	51.7	2.79	0.16	GSXF: glucose start xylose feed	Probst et al., 2013
	GSXF	FBB	60.4	60.1	3.42	0.17		
AS 2.1560	Γλυκόζη, μαννόζη	f	22	58.3	2.64	0.18	G <sup>25</sup> M <sup>47</sup>	Yang et al., 2014
CBS 1807	Γλυκόζη, fructose, sucrose	f	12.28	47.3	1.16	0.13	C/N 190	Matsakas et al., 2014
CH010	Υδρόλυμα καλαμποκιού	f	17.2	47	1.01	ND		Huang et al., 2014
DSM70296	Γλυκόζη, Ξυλόζη	B	85.4	48.9	ND	0.10	Study 7	Anschau et al., 2014
AS 2.1560	Ξυλόζη	f	11.4	60.4	ND	ND	Two-staged	Lin et al., 2014
DSM70296	Ξυλόζη	FBB	94.6	37.4	ND	0.17		Anschau et al., 2015
		f	–	~40	–	ND	5% starch soln	
NBRC 10381	Διάλυμα αμόλου	f	–	~20	–	ND	10% starch soln	Tanimura et al., 2014
ATCC 56304	Υδρόλυμα πίτουρου σιταριού	f	17.1	37.3	1.28	0.12		Probst et al., 2015
	Υδρόλυμα πίτουρου καλαμποκιού	f	23.5	33.3	1.57	0.13		

Στέλεχος	Υποστρώματα	Σύστημα	CDW (g/L)	Σύσταση λίπους (% w/w)	Παραγωγικότητα λίπους (g/L day)	Conversion (g oil/g sugar)	Optimum condition	Παραπομπές
DSM70296	Γλυκόζη	f	13.6	22.79	ND	ND		Leiva-Candia et al.,2015
	Υδρόλυμα άλευρου ηλίανθου	f	16.5	30.3	ND	ND		
-	Γλυκόζη	B	21.2	52	ND	ND	Acid pretreated cells, Pederson method	Bonturi et al., 2015
DSM70296	Γλυκόζη, Ξυλόζη	B	13	48	ND	ND	C/N 50, D 0.03/h	Anschau et al.,2015
		B	10	44	ND	ND	C/N 50, D 0.06/h	
Y-11557		f	24.7	12.3	ND	ND		
Y-27495	Γλυκόζη	f	30.7	51.2	ND	ND		Dien et al.,2016
Y-27494		f	29.6	49	ND	ND		
Y-27493		f	43.9	36.3	ND	ND		
DSM70296	Υδρόλυμα ζαχαροκάλαμου	B	9.6	26.1	ND	0.14		Xavier et al.,2017
		C	11.5	27.3	ND	0.18		
ATCC 56304	Γλυκόζη & Ξυλόζη	FBB	188.2	57.4	3.36	0.17		Probst et al.,2017
	Διφασικό (Γλυκόζη και μετά Ξυλόζη)	FBB	296.6	60.1	3.36	0.17	C:N 80	
CBS 1807	Γλυκόζη	FBB	13	60.47	ND	0.11	Xylose-acetate feeding	Brandenburg et al., 2016
		FBB	15.63	51.3	ND	0.10	Birchwoodhydrolysate feeding	
ATCC 58680	Γλυκόζη & Ξυλόζη	f	9.32	50.4	ND	0.16	G:X 2:1	Rahman et al.,2017
		f	9.43	56	ND	0.18	G:X 1:2	
BCRC 23408	Υδρόλυμα πίτουρου ρυζιού	f	13.5	52.59	1.92	0.24	1-staged	Sutanto et al., 2017
		f	23.1	56.11	2.60	0.21	Resuspension in DRBH (2-staged)	

Οι Angerbauer et al. (2008) πρωτοπόρησαν χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα για τη ζύμωση του *L. Starkeyi* ύψ καθαρισμού λυμάτων με την προσθήκη σακχάρου και το αποτέλεσμα ήταν 75,2% περιεκτικότητα σε λίπος, η οποία ήταν από τις υψηλότερες περιεκτικότητες σε λίπος που έχουν αναφερθεί για τον DSM 70295 με χρήση αποβλήτων. Με βάση αυτό το αποτέλεσμα, έγιναν κι άλλες έρευνες πάνω σε λύματα που όμως το περιεχόμενο σε λίπος ήταν αρκετά χαμηλό, χωρίς να ξεπερνάει το 25%. Ωστόσο, παρά το χαμηλό ποσοστό λίπους, διαπιστώθηκε ότι η ζύμη μπορούσε να καταναλώσει οργανικά συστατικά στην πρώτη ύλη, μειώνοντας έτσι το BOD, τις πρωτεΐνες ή το TOC στα απόβλητα.

Σε άλλες μελέτες χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλο και απόβλητα από άμυλο πατάτας αλλά η περιεκτικότητα σε λίπος δεν ξεπέρασε το 5%. Αντίθετα, οι Tsakona et al. (2014) χρησιμοποιώντας λύματα πλούσια σε άλευρα, για την καλλιέργεια του στελέχους DSM 70296, παρέλαβαν περιεκτικότητα σε λίπος 40% με ζύμωση batch και 57,8% με fed-batch.

Άλλα απόβλητα που διερευνήθηκαν για καλλιέργεια ζύμης είναι η μελάσα και η ακατέργαστη γλυκερόλη. Οι Vieira et al. (2014) χρησιμοποίησαν τη μελάσα και παρέλαβαν λίπος σε ποσοστό 32%, δεδομένου ότι η μελάσα περιέχει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, καθιστώντας το έτσι ένα καλό μέσο για την ανάπτυξη βιομάζας αλλά όχι για συσσώρευση λιπιδίων. Η επιπλέον προσθήκη σακχάρων θα ήταν ένας τρόπος για αύξηση του ποσοστού λίπους, καθιστώντας τον όμως ένα επιπρόσθετο κόστος. Εν τω μεταξύ, το ποσοστό λίπους με υπόστρωμα την γλυκερόλη, έφτασε το 30-50% και πιθανώς αυτή η διαφορά στα ποσοστά να οφείλεται στην διαφορετική σύσταση της πρώτης ύλης ή στην ικανότητα διαφορετικών στελεχών να καταναλώνουν ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα στη σύσταση βιομάζας και λίπους στην καλλιέργεια ζύμης σε απόβλητα ελαιουργίας, είναι σαφές πως το απόβλητο αυτό είναι πλούσιο σε άζωτο ενώ περιέχει λιγότερη γλυκόζη και επομένως συσσωρεύεται λιγότερο λίπος. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από την εργασία των Douvou et al. (2016), στην οποία η προσθήκη επιπλέον 30 g/L γλυκόζης προκάλεσε αύξηση τόσο στο ξηρό βάρος των κυττάρων, όσο και στην περιεκτικότητα λίπους. Αναφέρθηκε, επίσης, πως η παρουσία του αποβλήτου ελαιουργίας δεν επέδρασε θετικά στην καλλιέργεια, μιας και όταν ο *L.starkeyi* αναπτύχθηκε σε απλό υπόστρωμα και γλυκόζη χωρίς την παρουσία του αποβλήτου, απέδωσε περισσότερη βιομάζα και λίπος.

Παράμετροι όπως η περιεκτικότητα και η παραγωγικότητα λίπους είναι σημαντικά κριτήρια για την επιλογή στελέχους ζύμης. Δυστυχώς, η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος και η υψηλή περιεκτικότητα σε βιομάζα συνήθως δεν συνυπάρχουν. Ως εκ τούτου, οι συνθήκες της ζύμωσης πρέπει να ρυθμιστούν για να επιτευχθεί μεγάλη σύσταση τόσο σε βιομάζα, όσο και σε λίπος, δεδομένου πως η παραγωγικότητα λίπους είναι ανάλογη με τη βιομάζα, που με τη σειρά της η τελευταία εξαρτάται από την σύσταση του υποστρώματος σε θρεπτικά.

Τα ποσοστά λίπους με καλλιέργεια ζύμης σε διαφορετικά υποστρώματα ήταν από 20,3 σε 56%, με το μεγαλύτερο ποσοστό να επιτυγχάνεται σε υδρόλυμα πίτουρου ρυζιού. Λαμβάνοντας υπόψη την διαθεσιμότητα και τον όγκο τους, τα απόβλητα εδώδιμων φυτών όπως το πίτουρο ρυζιού, το άχυρο ρυζιού, το καλαμπόκι και το ζαχαροκάλαμο έχουν μεγάλες προοπτικές να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη εάν το μικροβιακό λίπος που θα παραχθεί προορίζεται για το εμπόριο, μιας και αυτά τα απόβλητα συλλέγονται μαζί με τη συγκομιδή του εδώδιμου μέρους του φυτού. Επομένως, δεν χρειάζεται να είναι απαραίτητη επιπρόσθετη γη για την καλλιέργεια τους. Εκτός από το χαμηλό κόστος και την υψηλή απόδοση σε παραγωγή λίπους, η χρήση αυτών των υποστρωμάτων είναι μια βοήθεια στην επίλυση της διάθεσης αποβλήτων.

## 4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη ζύμωση

Η ζύμωση με ελαιογόνες ζύμες υπό περιορισμένες συνθήκες συνήθως αποτελείται από 3 φάσεις: την εκθετική φάση, όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται ραγδαία, την φάση συσσώρευσης λίπους όπου τα κύτταρα παρουσιάζουν ελάχιστη ανάπτυξη και τη στατική φάση όπου μπορεί να εμφανιστεί διάσπαση λιπιδίων. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει πως κατά τη διάρκεια ζύμωσης με τον *L. starkeyi* υπήρχε και λανθάνουσα φάση (Matsakas et al. 2014, Yousuf et al. 2010). Σε αντίθεση με άλλες ελαιογόνες ζύμες που συνήθως αναπτύσσονται εύκολα, ο *L. starkeyi* τείνει να παρουσιάζει μια δυσκολία, ειδικά αν το υπόστρωμα είναι διαφορετικό από την προκαλλιέργεια. Αυτή η λανθάνουσα φάση θα επεκτείνει τον χρόνο καλλιέργειας οδηγώντας σε χαμηλή παραγωγικότητα λίπους. Υπάρχουν κάποιοι τρόποι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με σκοπό την μείωση της λανθάνουσας φάσης, όπως η αύξηση της συγκέντρωσης του εμβολίου και η προκαλλιέργεια του εμβολίου στο ίδιο μέσο με την ζύμωση.

Οι Sitepu et al. (2014), συνόψισαν τους παράγοντες που επηρεάζουν την συσσώρευση λιπιδίων και περιλαμβάνουν το στέλεχος και το είδος της ζύμης, το στάδιο ανάπτυξης, την πηγή και την αναλογία άνθρακα και αζώτου, υπόλοιπα θρεπτικά συστατικά, τη θερμοκρασία, το διαλύτο οξυγόνο και ο αερισμός, το pH, την παρουσία αλκοόλης και την προσαρμογή σε συγκεκριμένη πηγή άνθρακα.

Συχνά, ο υψηλός λόγος C/N επιφέρει χαμηλό ποσοστό βιομάζας και υψηλό ποσοστό λίπους (>40%), αν και υπάρχουν περιπτώσεις που δεν συμβαίνει αυτό. Για παράδειγμα, σε batch καλλιέργεια, με πηγή άνθρακα γλυκόζη, παρατηρήθηκε 40% ποσοστό λίπους σε αναλογία C/N 60 και 68% σε αναλογία 150. Όταν η σύσταση του υποστρώματος τροποποιήθηκε, η περιεκτικότητα σε λίπος ήταν 30% με αναλογία C/N 61,2.

Ο επόμενος σημαντικός παράγοντας της ζύμωσης είναι το pH του υποστρώματος. Το μέσο pH που αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι 5-6,5, αλλά φαίνεται πως ο *L. starkeyi* μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα εύρο φάσμα όξινο pH αλλά όχι πάνω από 6,5. Στην μελέτη των Angerbauer et al. (2008) διαπιστώθηκε ότι η περισσότερη συσσώρευση λίπους σε καλλιέργεια του *L. starkeyi* σε ιλύ καθαρισμού λυμάτων ήταν 56% σε pH 5, ενώ με αύξηση του pH στο 6,5 η περιεκτικότητα σε λίπος μειώθηκε σε 50% με αντίστοιχη αύξηση της βιομάζας. Αυτό υποδηλώνει ότι το χαμηλότερο pH που ωφελεί τη συσσώρευση λιπιδίων μπορεί να είναι επιζήμιο για την κυτταρική ανάπτυξη. Σε άλλη μελέτη, το pH του υποστρώματος μειώθηκε από 5 σε 2,8 στο τέλος της καλλιέργειας και το ποσοστό του λίπους έφτασε το 54,85% με αναλογία C/N=72. Η δυνατότητα μια ζύμη να ζει σε περιβάλλον με ελαφρώς όξινο pH είναι

ένα πλεονέκτημα αφού έτσι μπορεί να καταστείλει την μικροβιακή μόλυνση που είναι σημαντικό για τη βιομηχανική μικροβιολογία. Με βάση τα δεδομένα αυτά, φαίνεται ότι ο *L. starkeyi* μπορεί να αναπτυχθεί και να συσσωρεύσει λιπίδια σε ένα ευρύ φάσμα pH, γεγονός που δείχνει την προοπτική του *L. starkeyi* ως παραγωγό λίπους, δεδομένου πως είναι προτιμότερη η χρήση ζυμών που είναι ικανές να παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις σε λιπίδια παρά τη διακύμανση του pH. Επιπλέον, εάν μπορεί να αναπτυχθεί σε ελαφρώς όξινη κατάσταση, θα απαιτείται λιγότερη βάση για την ουδετεροποίηση του υδρολύματος, πράγμα που σημαίνει και μείωση του κόστους λειτουργίας.

Ο αερισμός και το διαλυτό οξυγόνο είναι παράγοντες πολύ σημαντικοί για τη ζύμωση και κυρίως για την ανάπτυξη της ζύμης. Καθώς ο υψηλότερος ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αυξάνοντας την ταχύτητα ανακίνησης αυξάνεται και η βιομάζα. Από την άλλη, η συσσώρευση λιπιδίων επιτυγχάνεται σε υπόστρωμα με περιορισμένο οξυγόνο, καθώς υπό αυτές τις συνθήκες αποκλείεται το μονοπάτι οξείδωσης της γλυκόζης, προκαλώντας έτσι συσσώρευση λίπους. Αυτό επιβεβαιώνεται με την εργασία των Yen et al. (2011), στην οποία η συσσώρευση λίπους ήταν μεγαλύτερη σε 25% διαλυτό οξυγόνο, ενώ η βιομάζα περισσότερη σε 60%. Ενώ οι ελαιογόνες ζύμες έχουν το πλεονέκτημα να ζουν σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (10 έως 25 °C) παράγοντας υψηλό ποσοστό λίπους, ωστόσο, αν η ζύμωση διεξάγεται σε μεγάλη κλίμακα θα χρειάζεται επιπλέον κόστος για την ψύξη. Παρόλο που οι περισσότερες ζυμώσεις στη βιβλιογραφία διεξήχθησαν στους 30 °C, υπάρχουν αναφορές για ζυμώσεις με τον *L. starkeyi* στους 28 °C και στους 25-26 °C.

Τέλος, η συγκέντρωση του εμβολίου θεωρείται επίσης σημαντικός παράγοντας της ζύμωσης. Η συγκέντρωση του εμβολίου που προορίζεται για ζύμωση κυμαίνεται συνήθως μεταξύ του 5 και 10%. Σύμφωνα με μελέτες που διεξήχθησαν σε διάφορα υποστρώματα όπως απόβλητα πλούσια σε άμυλο πατάτας, απόβλητα με όξινο γλουταμικό νάτριο και ακατέργαστη γλυκερόλη, η βέλτιστη συγκέντρωση εμβολίου για συσσώρευση λίπους ήταν 10%. Κατά την αύξηση της συγκέντρωσης, περισσότερη ποσότητα αζώτου εισερχόταν στο μέσο της ζύμωσης, οποία δεν ήταν ευνοϊκή για την συσσώρευση λίπους. Σε ότι αφορά στη φάση ανάπτυξης της ζύμης, το εμβόλιο λαμβανόταν συνήθως στην εκθετική του φάση και μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος.



### 4.3 Εκχύλιση λίπους

Δεδομένου ότι το λίπος είναι ένα ενδοκυτταρικό προϊόν, απαιτείται κάποια προκατεργασία για να σπάσει το κυτταρικό τοίχωμα πριν την εκχύλιση. Η προκατεργασία που γίνεται συνήθως είναι η υδρόλυση με HCl ή υπερήχους. Η ζύμη στη συνέχεια εκχυλίζεται με κάποιον οργανικό διαλύτη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η πλειοψηφία των λιπιδίων που συσσωρεύονται στη ζύμη είναι μη πολικά (κυρίως TAGs), αλλά το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από πολικά φωσφολιπίδια τα οποία συμβάλουν στην παραγωγή μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAME). Έτσι, για την εκχύλιση του λίπους πρέπει να χρησιμοποιηθούν πολικοί και μη πολικοί διαλύτες. Οι περισσότεροι ερευνητές προτιμούν να χρησιμοποιούν χλωροφόρμιο και μεθανόλη, αλλά δεδομένου ότι το χλωροφόρμιο είναι τοξικό, είναι προτιμότερο να αντικατασταθεί με άλλους διαλύτες, όπως το εξάνιο, η αιθανόλη και ο διεθυλαιθέρας.

Στην μελέτη των Uzuka et al. (1975) η πλειοψηφία των σφαιριδίων λίπους που βρέθηκαν στην απεικόνιση του *L. starkeyi* IAM 4753 ήταν TAG (85%), άλλα μικρότερα μέρη ήταν πολικά λιπίδια και πρωτεΐνη. Οι Naganuma et al. (1982) διαπίστωσαν πως το κύριο συστατικό των λιπιδίων ήταν TAG, ενώ τα φωσφολιπίδια, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), η εργοστερόλη και οι διάκυλογλυκερόλες (DAG) ήταν σε μικρότερο ποσοστό. Από την άλλη, οι Suzuki et al. (1973) διερεύνησαν διάφορες μεθόδους εκχύλισης λίπους σε λυοφιλωμένα κύτταρα του *L. starkeyi* IFO 0678 και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η μέθοδος που έδινε το υψηλότερο ποσοστό λίπους ήταν η κατεργασία με HCl και η ανάδευση των κυττάρων για 3 ώρες σε 40% χλωροφόρμιο:μεθανόλη (1:1) επαναλαμβανόμενη 3 φορές.

Παρατηρήθηκε πως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα στα TAG, FFA και φωσφολιπίδια μειώνονταν στο τελευταίο στάδιο της ζύμωσης (Suzuki et al., 1974). Αντίθετα, οι Deinema et al. (1956) διαπίστωσαν πως η παράταση της ζύμωσης για 3 εβδομάδες οδήγησε στην αύξηση του ελαϊκού οξέος από 55 σε 62%, αλλά παρατηρήθηκε μικρή μείωση άλλων λιπαρών οξέων. Ανέφεραν πως η σύσταση λιπαρών οξέων ήταν παρόμοια κατά τη διάρκεια διαφορετικών φάσεων της ζύμωσης και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στη συνολική ποσότητα κορεσμένων (33,5%) και ακόρεστων (63%) λιπαρών οξέων, ανεξάρτητα από τα στάδια της καλλιέργειας.

#### 4.4 Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα του λίπους ενός στελέχους ζύμης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το υπόστρωμα στο οποίο γίνεται η ζύμωση και στις συνθήκες αυτής. Για παράδειγμα, ο βαθμός κορεσμού των λιπιδίων της ζύμης επηρεάζεται από τη θερμοκρασία της καλλιέργειας (Chuck et al., 2014). Οι Wu et al. (2011) απέδειξαν πως η υψηλότερη αναλογία άνθρακα προς θείο ευνοεί την παραγωγή κορεσμένων λιπαρών οξέων. Το προφίλ των λιπαρών οξέων μπορεί να παραληφθεί με την πλήρη μετατροπή των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Επειδή τα περισσότερα λίπος της ζύμης αποτελείται από TAG, απαιτείται συνήθως μια μέθοδος 2 σταδίων: η αφαίρεση του μη σαπωνοποιήσιμου μέρους και η μεθυλίωση των λιπαρών οξέων.

Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα, τα περισσότερα λιπαρά οξέα του λίπους του *L. starkeyi* είναι C18: 1 (ελαϊκό) και C16: 0 (παλμιτικό), ανεξάρτητα από το στέλεχος. Εξαίρεση είναι το στέλεχος AS 2.1560 το οποίο έχει ένα ιδιόμορφο προφίλ λιπαρών οξέων στο οποίο τα περισσότερα λιπαρά οξέα είναι παλμιτικό και μυριστικό με μικρή ποσότητα ελαϊκού οξέος. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε το οποίο δεν ήταν κατάλληλο για το σχηματισμό των επιθυμητών λιπαρών οξέων. Πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο το σύστημα καλλιέργειας (batch, fed-batch, continuous) όσο και η σύνθεση του μέσου ζύμωσης επηρεάζουν σημαντικά τη σύσταση λιπαρών οξέων. Τέλος, συγκρίνοντας τη σύσταση των λιπαρών οξέων του *L. starkeyi* με αυτήν από κοινά φυτικά έλαια, φαίνεται ότι έχουν παρόμοια σύσταση ανεξάρτητα από το στέλεχος, το υπόστρωμα και το σύστημα καλλιέργειας. Αυτό ενισχύει την άποψη πως το μικροβιακό λίπος παραγόμενο από αυτή τη ζύμη μπορεί να είναι υποψήφιο ως πρώτη ύλη για παραγωγή βιοντίζελ στο μέλλον.

**Πίνακας 4.2** Σύσταση λιπαρών οξέων διαφόρων στελεχών του *L. starkeyi*

Στέλεχος	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	Παραπομπή
DSM 70295	0.9	55.93	1.85	13.8	25.89	<0.1	0.12	0.48	0.18	0.48	Angerbauer et al. (2008)
AS 2.1560	0.5	36.6	4.3	6.2	48.9	1.1					Zhao et al. (2008)
–	<1	19.1	0.5	8.5	49.1	18.8	3.5	0.2			Yousuf et al. (2010)
Y-11557		39	3	3	55						Wild et al. (2010)
ATCC 12659		36.2		4.5	46.3	3.4					Yu et al. (2011)
AS 2.1560	0.5	36.5	3.6	5.4	52.8	1.2					Lin et al. (2011)
AS 2.1560	11.15	45.99	0.87	9.37	8.99	4.2	11.05	8.38			Huang et al. (2011)
DSM70296		38	3.7	4.2	51.7	1.3					Gong et al. (2012)
AS 2.1560	0.7	33.8	4.1	11.5	49	2.3					Yang et al. (2014)
AS 2.1560		35.8	4	7.5	43.8	4.1					Wang et al. (2014)
DSM70296		27.8	6	3.7	48.2	10.1					Xavier et al. (2014)
Y-11557		39.3	4.3		7.8	42.5	4.2				Spier et al. (2015)
Y-11557		0.9	35.2	3	10.3	46.5	2.7		0.8	0.6	Calvey et al. (2016)
DSM70296			29.44	5.73	5.41	56	3.4				Leiva-Candia et al. (2015)

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η σύσταση σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους που παράγει ο *Lipomyces starkeyi* σε υπόστρωμα το BSG αποτελείται από: 0,3-0,6% (14:0), 38,1-39,1% (16:0), 1,2-1,6% (16:1), 8,3-8,7% (18:0), 44,4-48,5% (18:1), 2,6-5,6%(18:2) και είναι παρόμοια με αυτή του φοινικέλαιου.

Πέρα από την παρούσα μελέτη, η παραγωγή λίπους με υπόστρωμα το BSG έχει μελετηθεί ακόμη μια φορά από τους Jacobs et al. (2009). Στην έρευνα αυτή μελετήθηκε η παραγωγή εικοσιπεντανοϊκού οξέος από διάφορα στελέχη μύκητα του γένους *Mortierella*. Παρατηρήθηκε πως την περισσότερη σύσταση σε λίπος την είχε ο *M. sarnyensis* Mo 064 (8,2%, w/w), ενώ την μικρότερη *M. alpina* Mo 073 (2,1%, w/w).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Aliyu, S., & Bala, M. (2011). Brewer's spent grain: a review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 324-331.
- Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., & Guebitz, G. M. (2008). Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource technology*, 99(8), 3051-3056.
- Anschau, A., & Franco, T. T. (2015). Cell mass energetic yields of fed-batch culture by *Lipomyces starkeyi*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(8), 1517-1525.
- Anschau, A., & Franco, T. T. (2015). Continuous Cultivations of the Oleaginous Yeast *Lipomyces starkeyi*. *Blucher Biochemistry Proceedings*, 1(2), 9-12.
- Anschau, A., Xavier, M. C., Hernalsteens, S., & Franco, T. T. (2014). Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource technology*, 157, 214-222.
- Azad, A., Yousuf, A., Ferdoush, A., Hasan, M. M., & Karim, M. R. (2014). Production of microbial lipids from rice straw hydrolysates by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel synthesis. *J Microb Biochem Technol S*, 8(2).
- Balan, V. (2014). Current challenges in commercially producing biofuels from lignocellulosic biomass. *ISRN biotechnology*, 2014.
- Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E., Aggeli, D., Elazzazy, A. M., Baeshen, M. N., & Aggelis, G. (2016). Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Current opinion in Biotechnology*, 37, 24-35.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Glycolysis and gluconeogenesis. *Biochemistry*.
- Boekhout, T., & Robert, V. (Eds.). (2003). *Yeasts in food*. Elsevier. p. 349.
- Bonturi, N., Matsakas, L., Nilsson, R., Christakopoulos, P., Miranda, E., Berglund, K., & Rova, U. (2015). Single cell oil producing yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium toruloides*: Selection of extraction strategies and biodiesel property prediction. *Energies*, 8(6), 5040-5052.

Brandenburg, J., Blomqvist, J., Pickova, J., Bonturi, N., Sandgren, M., & Passoth, V. (2016). Lipid production from hemicellulose with *Lipomyces starkeyi* in a pH regulated fed-batch cultivation. *Yeast*, 33(8), 451-462.

Calvey, C. H., Su, Y. K., Willis, L. B., McGee, M., & Jeffries, T. W. (2016). Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource technology*, 200, 780-788.

Chegg : <http://www.chegg.com/homework-help/definitions/glycolysis-14> (visited on 13/08/2018)

Chen, X., Li, Z., Zhang, X., Hu, F., Ryu, D. D., & Bao, J. (2009). Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Applied biochemistry and biotechnology*, 159(3), 591.

Choi, C. Q. (2010). "Archeologists Link Rise of Civilization and Beer's Invention". CBS News. (visited on 12/08/2018)

Chuck, C. J., Santomauro, F., Sargeant, L. A., Whiffin, F., Chantasuban, T., Ghaffar, N. R. A., ... & Scott, R. J. (2014). Liquid transport fuels from microbial yeasts—current and future perspectives. *Biofuels*, 5(3), 293-311.

Craig Townsend (2010). *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. Elsevier. p. 970.

Deinema, M. H., & Landheer, C. A. (1956). Composition of fats, produced by *lipomyces starkeyi*, under various conditions. *Archiv für Mikrobiologie*, 25(2), 193-200.

Dien, B. S., Slininger, P. J., Kurtzman, C. P., Moser, B. R., & O'Bryan, P. J. (2016). Identification of superior lipid producing *Lipomyces* and *Myxozyma* yeasts. *AIMS Environ Sci*, 3(1), 1-20.

Dietrich, O., Heun, M., Notroff, J., Schmidt, K., & Zarnkow, M. (2012). The role of cult and feasting in the emergence of Neolithic communities. New evidence from Göbekli Tepe, south-eastern Turkey. *Antiquity*, 86(333), 674-695.

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

DreherBreweries:[http://www.dreherrt.hu/portal/main.php?heading\\_id=27&article\\_id=&language=en](http://www.dreherrt.hu/portal/main.php?heading_id=27&article_id=&language=en) (visited on 12/08/2018)

- El-Naggar, N. E. A. A., El-Hersh, M. S., El-Fadaly, H. A., & Saber, W. I. (2011). Bioconversion of some agro-industrial by-products into single cell oil using *Candida albicans* NRRL Y-12983 and *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557. *Research Journal of Microbiology*, 6(11), 784-795.
- Eroshin, V. K., & Krylova, N. I. (1983). Efficiency of lipid synthesis by yeasts. *Biotechnology and bioengineering*, 25(7), 1693-1700.
- Faulds, C., Sancho, A., & Bartolomé, B. (2002). Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(4), 489-494.
- Fox, G. P. (2009). *Genetics and improvement of barley malt quality*. University Press, Springer, 223, 224.
- Garrett Oliver (2011). *The Oxford Companion to Beer*. Oxford University Press. p. 533.
- Garrett Oliver (2011). *The Oxford Companion to Beer*. Oxford University Press. p. 532.
- Gong, Z., Wang, Q., Shen, H., Hu, C., Jin, G., & Zhao, Z. K. (2012). Co-fermentation of cellobiose and xylose by *Lipomyces starkeyi* for lipid production. *Bioresource technology*, 117, 20-24.
- González, S. S., Barrio, E., & Querol, A. (2008). Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(8), 2314-2320.
- Hansen, E. C. (1896). *Practical studies in fermentation: being contributions to the life history of micro-organisms*. E. & FN Spon.
- Hansen, E. C. (1896). *Practical studies in fermentation: being contributions to the life history of micro-organisms*. E. & FN Spon.
- Huang, C., Chen, X. F., Xiong, L., Ma, L. L., & Chen, Y. (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology advances*, 31(2), 129-139.
- Huang, C., Chen, X. F., Yang, X. Y., Xiong, L., Lin, X. Q., Yang, J., ... & Chen, X. D. (2014). Bioconversion of corn cob acid hydrolysate into microbial oil by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(4), 2197-2204.
- Huige, N. J. (1995). *Brewery by-products and effluents*. FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-, 501-550.

Ikuri, S. A. (1995). Preservation of brewers yeast slurry by a simple on-farm adaptable technology and its effect on performance of weaner pigs. *Animal feed science and technology*, 53(3-4), 353-358.

Jacobs, A., Botha, A., & Van Zyl, W. H. (2009). The production of eicosapentaenoic acid by representatives of the genus *Mortierella* grown on brewers' spent grain. *Biologia*, 64(5), 871-876.

Jin, M., Slininger, P. J., Dien, B. S., Waghmode, S., Moser, B. R., Orjuela, A., ... & Balan, V. (2015). Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in biotechnology*, 33(1), 43-54.

Kawaguchi, H., Vertès, A. A., Okino, S., Inui, M., & Yukawa, H. (2006). Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(5), 3418-3428.

Kirinholdings: "Global Beer Consumption by Country in 2013" (2014, December 24) [https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2014/1224\\_01.html](https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2014/1224_01.html) (visited on 12/08/2018)

Kunze, W. (1996). *Technology Brewing and Malting*, translated by Dr. Trevor Wainwright. Berlin, Germany: VLB Berlin.

Lea, Piggott & Howard 2003, p. 42

Lea, Piggott & Howard 2003, pp. 43–44

Leiva-Candia, D. E., Tsakona, S., Kopsahelis, N., Garcia, I. L., Papanikolaou, S., Dorado, M. P., & Koutinas, A. A. (2015). Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for integrated synthesis of microbial oil and value-added co-products. *Bioresource technology*, 190, 57-65.

Lin, J., Li, S., Sun, M., Zhang, C., Yang, W., Zhang, Z., ... & Li, S. (2014). Microbial lipid production by oleaginous yeast in d-xylose solution using a two-stage culture mode. *RSC Advances*, 4(66), 34944-34949.

Lin, J., Shen, H., Tan, H., Zhao, X., Wu, S., Hu, C., & Zhao, Z. K. (2011). Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. *Journal of biotechnology*, 152(4), 184-188.

Liu, H., Zhao, X., Wang, F., Jiang, X., Zhang, S., Ye, M., ... & Zou, H. (2011). The proteome analysis of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *FEMS yeast research*, 11(1), 42-51.

- Liu, J. X., Yue, Q. Y., Gao, B. Y., Wang, Y., Li, Q., & Zhang, P. D. (2013). Research on microbial lipid production from potato starch wastewater as culture medium by *Lipomyces starkeyi*. *Water Science and Technology*, 67(8), 1802-1808.
- Liu, L. P., Zong, M. H., Hu, Y., Li, N., Lou, W. Y., & Wu, H. (2017). Efficient microbial oil production on crude glycerol by *Lipomyces starkeyi* AS 2.1560 and its kinetics. *Process Biochemistry*, 58, 230-238.
- Longmanbrewery: <https://www.longmanbrewery.com/brewing/> (visited on 12/08/2018)
- Mariani, E. (1953). Chromatographic examination of the amino acids of beer and spent grains. *Brass Malt Belg*, 3, 50-53.
- Markowski, P. (2004). *Farmhouse Ales: Culture and Craftsmanship in the European Tradition*. Brewers Publications.
- Matsakas, L., Sterioti, A. A., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2014). Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807. *Industrial Crops and Products*, 62, 367-372.
- Mauk, B. (2013). "When Was Beer Invented?". <https://www.livescience.com/32424-when-was-beer-invented.html> (visited on 09/08/2018)
- Mills, K. L. (2013). Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresource technology*, 144, 360-369.
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of cereal science*, 43(1), 1-14.
- Naganuma, T., Uzuka, Y., & Tanaka, K. (1985). Physiological factors affecting total cell number and lipid content of the yeast, *Lipomyces starkeyi*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 31(1), 29-37.
- Naganuma, T., Uzuka, Y., Tanaka, K., & Iizuka, H. (1987). Differences in enzyme activities of *Lipomyces starkeyi* between cells accumulating lipid and proliferating cells. *Journal of basic microbiology*, 27(1), 35-42.
- Nelson, M. (2005). *The barbarian's beverage: A history of beer in ancient Europe*. Routledge.
- Noonan, G. J. (2003). *New Brewing Lager Beer: The Most Comprehensive Book for Home and Microbrewers*. Brewers Publications.



- Oguri, E., Masaki, K., Naganuma, T., & Iefuji, H. (2012). Phylogenetic and biochemical characterization of the oil-producing yeast *Lipomyces starkeyi*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(2), 359-368.
- Oliver, G., & Colicchio, T. (2011). *The Oxford companion to beer*. Oxford University Press.
- Ou, S., & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261-1269.
- Owades, J. L. (1992). U.S. Patent No. 5,120,557. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Priest & Stewart 2006, p. 84
- Priest, F. G., & Stewart, G. G. (Eds.). (2006). *Handbook of brewing*.
- Probst, K. V., & Vadlani, P. V. (2015). Production of single cell oil from *Lipomyces starkeyi* ATCC 56304 using biorefinery by-products. *Bioresource technology*, 198, 268-275.
- Probst, K. V., & Vadlani, P. V. (2017). Single cell oil production by *Lipomyces starkeyi*: Biphasic fed-batch fermentation strategy providing glucose for growth and xylose for oil production. *Biochemical engineering journal*, 121, 49-58.
- Rahman, S., Arbter, P., Popovic, M., Bajpai, R., & Subramaniam, R. (2017). Microbial lipid production from lignocellulosic hydrolyzates: effect of carbohydrate mixtures and acid-hydrolysis byproducts on cell growth and lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(8), 1980-1989.
- Rainieri, S. (2009). The brewer's yeast genome: from its origins to our current knowledge. In *Beer in health and disease prevention* (pp. 89-101). Academic Press.
- Robertson, J. A., I'Anson, K. J., Treimo, J., Faulds, C. B., Brocklehurst, T. F., Eijsink, V. G., & Waldron, K. W. (2010). Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 890-896.
- Santos, M., Jiménez, J. J., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., & Del Nozal, M. J. (2003). Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chemistry*, 80(1), 17-21.
- Sitepu, I. R., Garay, L. A., Sestric, R., Levin, D., Block, D. E., German, J. B., & Boundy-Mills, K. L. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 32(7), 1336-1360.
- Sitepu, I. R., Sestric, R., Ignatia, L., Levin, D., German, J. B., Gillies, L. A., ... & Boundy-

- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. (2013). *Fundamentals of analytical chemistry*. Nelson Education.
- Spier, F., Buffon, J. G., & Burkert, C. A. (2015). Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: lipid content and fatty acid profile of biomass. *Indian journal of microbiology*, 55(4), 415-422.
- Sridevi, B., Sridharan, V., Sowmya, D., & Yuvaraj, R. (2017). Microbial oil—A plausible alternate resource for food and fuel application. *Bioresource technology*.
- Steiner, J., Procopio, S., & Becker, T. (2015). Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *European Food Research and Technology*, 241(3), 303-315.
- Sutanto, S., Go, A. W., Chen, K. H., Nguyen, P. L. T., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2017). Release of sugar by acid hydrolysis from rice bran for single cell oil production and subsequent in-situ transesterification for biodiesel preparation. *Fuel Processing Technology*, 167, 281-291.
- Sutanto, S., Zullaikah, S., Tran-Nguyen, P. L., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2018). *Lipomyces starkeyi*: Its current status as a potential oil producer. *Fuel Processing Technology*, 177, 39-55.
- Suutari, M., Priha, P., & Laakso, S. (1993). Temperature shifts in regulation of lipids accumulated by *Lipomyces starkeyi*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(9), 891-894.
- Suzuki T., Hasegawa K., Lipid molecular species of *Lipomyces starkeyi*, *Agric. Biol. Chem.* 38 (1974) 1371–1376.
- Suzuki, T., Takigawa, A., & Hasegawa, K. (1973). Lipid extraction methods for *Lipomyces starkeyi*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37(11), 2653-2656.
- Tang, Z., Cenkowski, S., & Izydorczyk, M. (2005). Thin-layer drying of spent grains in superheated steam. *Journal of Food Engineering*, 67(4), 457-465.
- Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., ... & Shima, J. (2014). *Cryptococcus terricola* is a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. *Scientific reports*, 4, 4776.
- Tapia, E., Anschau, A., Coradini, A. L., Franco, T. T., & Deckmann, A. C. (2012). Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. *AMB express*, 2(1), 64.

Tchakouteu, S. S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & 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(4), 911-927.

Terry Foster (7 Apr 1999). *Pale Ale*. Brewers Publications. p. 185.

Tom Colicchio (2011). *The Oxford Companion to Beer*. Oxford University Press.

Torres y Torres, J. L., & Rosazza, J. P. (2001). Microbial Transformations of p-Coumaric Acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. *Journal of Natural Products*, 64(11), 1408-1414.

Townsley, P. M. (1979). Preparation of commercial products from brewer's waste grain and trub [Protein flours]. *Technical Quarterly Master Brewers Association of America*.

Tsakona, S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Kookos, I. K., & Koutinas, A. A. (2014). Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Journal of biotechnology*, 189, 36-45.

Uzuka, Y., Kanamori, T., Koga, T., Tanaka, K., & Naganuma, T. (1975). Isolation and chemical composition of intracellular oil globules from the yeast *Lipomyces starkeyi*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 21(3), 157-168.

Vieira, J. P. F., Ienczak, J. L., Rossell, C. E. V., Pradella, J. G. C., & Franco, T. T. (2014). Microbial lipid production: screening with yeasts grown on Brazilian molasses. *Biotechnology letters*, 36(12), 2433-2442.

Wade, L. G. (2006). 17. Reactions of Aromatic Compounds. *Organic Chemistry*, 749-804.

Westerdijk institute: <http://www.westerdijk.nl/Collections/BioMICS.aspx?TableKey=14682616000000012&Rec=480&Fields=All> (visited on 13/08/2018)

Wild, R., Patil, S., Popović, M., Zappi, M., Dufreche, S., & Bajpai, R. (2010). Lipids from *Lipomyces starkeyi*. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 329-335.

Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q., & Zhao, Z. K. (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource technology*, 102(2), 1803-1807.

Xavier, M. C. A., Coradini, A. L. V., Deckmann, A. C., & Franco, T. T. (2017). Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. *Biochemical engineering journal*, 118, 11-19.

- Xavier, M. C., & Franco, T. T. (2014). Batch and continuous culture of hemicellulosic hydrolysate from sugarcane bagasse for lipids production. *Chem. Eng. Trans*, 38.
- Xiros, C., & Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. *Waste and Biomass Valorization*, 3(2), 213-232.
- Yamauchi, H., MORI, H., KOBAYASHI, T., & SHIMIZU, S. (1983). Mass production of lipids by *Lipomyces starkeyi* in microcomputer-aided fed-batch culture. *J. Ferment. Technol.*, 61, 275-281.
- Yang, X., Jin, G., Gong, Z., Shen, H., Song, Y., Bai, F., & Zhao, Z. K. (2014). Simultaneous utilization of glucose and mannose from spent yeast cell mass for lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource technology*, 158, 383-387.
- Yen, H. W., & Zhang, Z. (2011). Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 112(1), 71-74.
- Yousuf, A., Sannino, F., Addorisio, V., & Pirozzi, D. (2010). Microbial conversion of olive oil mill wastewaters into lipids suitable for biodiesel production. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), 8630-8635.
- Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K. M., & Chen, S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*, 102(10), 6134-6140.
- Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., Feng, B., & Zhao, Z. (2008). Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 405-412.
- Zhu, L. Y., Zong, M. H., & Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99(16), 7881-7885.