



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

«Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου»

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Επεξεργασία & Συντήρηση Τροφίμων»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων πλούσιων σε γ-λινολενικό οξύ μέσω μικροβιακών
ζυμώσεων με τη χρήση απόβλητων λαχανικών*



ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Χ. ΧΑΛΕΠΑΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

«Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου»

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Επεξεργασία & Συντήρηση Τροφίμων»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων πλούσιων σε γ-λινολενικό οξύ μέσω μικροβιακών
ζυμώσεων με τη χρήση απόβλητων λαχανικών*



ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Χ. ΧΑΛΕΠΑΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων πλούσιων σε γ-λινολενικό οξύ μέσω
μικροβιακών ζυμώσεων με τη χρήση απόβλητων λαχανικών*

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Χ. ΧΑΛΕΠΛΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή: Επ. Καθηγητής Απόστολος Κουτίνας

Καθηγητής Νικόλαος Στοφόρος

Αν. Καθηγήτρια Ιωάννα Μαντάλα

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, η συνεχόμενη αύξηση απόβλητων τροφίμων, έχει οδηγήσει στην ανάγκη αξιοποίησής τους. Μέσω των βιοδιεργασιών που πραγματοποιούνται, για την επίτευξη της εκμετάλλευσης αποβλήτων, ευνοείται σημαντικά η βιοοικονομία, καθώς μηδενικής αξίας απόβλητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα ή αζώτου. Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, πραγματοποιήθηκε με στόχο την μελέτη της αξιοποίησης απόβλητων λαχανικών, καθώς αποτελούν ένα από τα μεγαλύτερα ποσοστά τροφίμων, που απορρίπτονται ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο. Πρώτο βήμα της μελέτης μας αποτέλεσε ο προσδιορισμός της βιοχημικής σύστασης του αποβλήτου και στη συνέχεια, η αξιοποίησή του ως βιοδιυλιστήριο. Η εκμετάλλευση του αποβλήτου μέσω βιοδιυλιστηρίου, αποσκοπεί στη παραλαβή προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως αντιοξειδωτικών συστατικών, πρωτεϊνών και λιπαρών οξέων που δεν συντίθενται από τον ανθρώπινο οργανισμό. Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών πραγματοποιήθηκε μέσω 2 μεθόδων, του επωαστήρα υπό ανάδευση και μέσω του υδατόλουτρου υπερήχων με τη χρήση διαφορετικών διαλυτών (EtOH, EtOH-HCl, MeOH, MeOH-HCl) σε διαφορετικές αραιώσεις (1:30 w/v, 1:40 w/v, 1:80 w/v), ώστε να διαπιστωθεί ο καλύτερος συνδυασμός, για την παραλαβή της μέγιστης ολικής φαινολικής περιετικότητας. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση των πρωτεϊνών χημικά. Το στερεό υπόλειμμα, έπειτα από την απομάκρυνση των προαναφερθέντων συστατικών, υπεβλήθη σε διαδικασία ενζυμικής υδρόλυσης, με τη χρήση εμπορικών ενζύμων, ώστε να παραχθεί υδρόλυμα, πλούσιο κυρίως σε γλυκόζη.

Στην παρούσα εργασία, αξιολογήθηκε η δυνατότητα παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, προερχόμενες από την ενζυμική υδρόλυση του φωλλώδους μέρους του μπρόκολου.

Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου, με το μυκητιακό στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411, αρχικά διεξήχθησαν και μελετήθηκαν σε συνθετικά υποστρώματα που περιείχαν διάφορους μονοσακχαρίτες ως πηγές άνθρακα (γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, αραβινόζη). Η αραβινόζη δεν αφομοιώθηκε ικανοποιητικά από το μυκητιακό στέλεχος, με αποτέλεσμα τη χαμηλή συσσώρευση σε ενδοκυτταρικό λίπος (0,054 g/L). Εν αντιθέσει, στα υπόλοιπα εμπορικά θρεπτικά υποστρώματα η λιποπεριεκτικότητα έφτασε σε υψηλά επίπεδα (39,56-36,56% w/w), με

την μεγαλύτερη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους να εμφανίζεται στη μαννόζη, με συγκέντρωση που ανήλθε στα 3,96 g/L

Ακολούθησαν πειράματα έχοντας ως θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, μίγμα συνθετικών σακχάρων, προσομοιωμένο στη σύσταση των σακχάρων που περιέχονται στα υδρολύμα, προερχόμενο από την υδρόλυση φύλλων του μπρόκολου, όπως επίσης και στο καθαυτό υδρολύμα. Παρότι, το μικροβιακό στέλεχος κατανάλωσε την πηγή άνθρακα από το υδρολύμα, παρατηρήθηκε μη ικανοποιητική παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (1,55 g/L), με λιποπεριεκτικότητα μόλις το 14% w/w.

Το μικροβιακό λίπος που παρήχθη από όλα τα προαναφερθέντα θρεπτικά υποστρώματα, αξιολογήθηκε ως προς την σύσταση των περιεχόμενων σε αυτό λιπαρών οξέων. Τα κυριότερα λιπαρά οξέα ήταν το ελαϊκό οξύ (37,28-58,12 %), το παλμιτικό οξύ (15,33-24,38%), ακολουθούμενα από το λινελαϊκό οξύ (11,68-18,58%) και το γ-λινολενικό οξύ (GLA) (11,98-19,67%). Όσον αφορά στην περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων σε GLA, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων με τα μεγαλύτερα ποσοστά να παρουσιάζονται στις ζυμώσεις που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα η μαννόζη. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως το GLA είχε αυξητική τάση όσο προχωρούσε ο χρόνος των μικροβιακών ζυμώσεων με μόνη εξαίρεση τη γλυκόζη, με την χρήση της οποίας δεν παρατηρήθηκε το συγκεκριμένο φαινόμενο.

Λέξεις κλειδιά: βιοδιωλιστήριο, μπρόκολο, γ-λινολενικό οξύ

ABSTRACT

The last decades, the highly increasing amounts of food waste, which makes their exploitation essential. Bioprocess exploitation of food waste promotes financial growth, by leveraging zero-value waste as a source of nitrogen and carbon. This work focuses on the valorization of vegetable waste, which comprise the majority of the annual food waste worldwide. Additionally, the exploitation of waste as a biorefinery has the potential to produce products such as antioxidants, proteins and fatty acids, which can not be provided by the human body. In this study, we first identify the biochemical composition of the waste, and then we explore its biorefinery capabilities. Two methods were used for the extraction of antioxidants, the agitator incubator and the ultrasonic water bath, employing various solvents (EtOH, EtOH-HCl, MeOH, MeOH-HCl) in several dilutions (1:30 w/v, 1:40 w/v, 1:80 w/v), to determine the most favorable combination based on the maximum total phenolic content. Subsequently, the chemical extraction of proteins took place. Finally, the solid residue was enzymatically hydrolyzed via the usage of commercial enzymes, to produce hydrolysate rich in glucose.

In the present study, the potential production of microbial lipids using renewable raw materials, deriving from the enzymatic hydrolysis of broccoli leaves, was evaluated.

Shake flask batch fermentations with the fungal strain *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 were initially conducted and investigated on synthetic substrates containing various monosaccharides as carbon sources (glucose, mannose, galactose, xylose, arabinose). Arabinose was not sufficiently metabolized by this fungal strain, resulting in a low accumulation of intracellular lipids (0,054 g/L). In contrast, the other commercial substrates, led to high lipids content (36,54-39,56 % w/w), with the highest accumulation occurring in the case of mannose, reaching a lipid concentration of 3,96 g/L.

Experiments using a mixture of synthetic sugars, simulated to the composition of sugars contained in the hydrolysate, deriving from the hydrolysis of broccoli leaves, as well as using the renewable hydrolysate, followed. Although the microbial strain consumed the carbon source of the hydrolysate, low lipids production (1,55 g/L) was observed with a lipid content of just 14% w/w.

The microbial lipids produced from all of the aforementioned fermentative substrates were evaluated for the composition of their fatty acids. The predominant fatty acid was oleic acid (37,28-58,12 %), palmitic acid (15,33-24,38 %), followed by linoleic acid (11,68-18,58 %) and γ -linolenic acid (GLA) (11,98-19,67 %). Regarding the GLA content, no significant variations were observed between the different substrates, with the highest percentage achieved when mannose was utilized. Finally, it is worth noting that GLA had an increasing tendency as microbial fermentations proceeded with the time, except for glucose, that did not show the particular phenomenon.

Keywords: biorefinery, broccoli, γ -linolenic acid

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου με κατεύθυνση « Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων», του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018.

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου επίκουρο καθηγητή κ. Κουτίνα Απόστολο τόσο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, όσο και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα καινοτόμο και ενδιαφέρον θέμα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Στοφόρο Νικόλαο και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μαντάλα Ιωάννα για τις εξαιρετικές συμβουλές τους, που εξέλαβα στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος. Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου «Μηχανικής Τροφίμων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, τα οποία συνέβαλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Ιδιαίτερος, απευθύνω την ευγνωμοσύνη μου στη διδάκτορα Πατεράκη Χρυσάνθη και στην υποψήφια διδάκτορα Τσούκο Ερμίντα για την συνεχή καθοδήγηση και την υπομονή τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στους φίλους και την οικογένεια μου για την ενθάρυνση και την υποστήριξή τους καθόλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Απόβλητα λαχανικών	14
1.2 Μπρόκολο	16
1.3 Βιοδραστικές ενώσεις	20
1.4 Πρωτεΐνες	20
1.5 Δομή βιομάζας των λαχανικών	21
1.6 Βιοδιωλιστήριο	24
1.7 Αξιοποίηση αποβλήτων λαχανικών για την παραγωγή προϊόντων μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων	25
1.8 Λιπαρά Οξέα	26
1.9 Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (SCO) μέσω μικροβιακών ζυμώσεων	26
1.10 γ -λινολενικό οξύ (GLA, <i>cis</i> -6,9,12-octadecatrienoic acid)	27
1.11 Εφαρμογές GLA	28
1.12 Μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης μικροβιακών λιπιδίων σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς	28
1.13 Βιογένεση των απαραίτητων λιπαρών οξέων	32
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.1 Συλλογή αποβλήτου λαχανικού	35
2.2 Ζυμώσεις	35
2.3 Θρεπτικό Υπόστρωμα	35
2.4 Ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας σε κωνικές φιάλες	37
2.5 Αναλύσεις	37
2.5.1 Προσδιορισμός υγρασίας	37
2.5.2 Προσδιορισμός και μέτρηση του pH	38
2.5.3 Εκχύλιση αντιοξειδωτικών	38
2.5.4 Εκχύλιση Πρωτεϊνών	38
2.5.5 Προσδιορισμός Πρωτεϊνών	39
2.5.6 Εκχύλιση διαλυτών ενώσεων σε νερό και αιθανόλη (extractives)	40
2.5.7 Ποσοτικός προσδιορισμός λιγνίνης και μονοσακχαριτών προερχόμενων από υδρόλυση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, σε στερεά δείγματα βιομάζας (NREL) 41	
2.5.8 Υδρολύσεις	44
2.5.9 Προσδιορισμός τέφρας	44

2.5.10	Προσδιορισμός λίπους-----	45
2.5.11	Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen - FAN) 45	
2.5.12	Προσδιορισμός Ανόργανου Φωσφόρου (IP)-----	46
2.5.13	Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) -----	47
2.5.14	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου μέσω της μεθόδου Folin – Ciocalteau-----	48
2.5.15	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της μεθόδου DPPH--	48
2.5.16	Προσδιορισμός Σπορίων -----	49
2.5.17	Συλλογή και προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας-----	50
2.5.18	Προσδιορισμός αναγώντων σακχάρων μέσω της μεθόδου DNS -----	50
2.5.19	Προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους -----	51
2.5.20	Μεθυλεστεροποίηση-----	51
2.5.21	Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία -----	52
2.5.22	Προσδιορισμός του δείκτη ακορεστότητας των λιπαρών οξέων(UI) -----	52
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ -----	53
3.1	Αποτελέσματα Σύστασης-----	53
3.2	Αποτελέσματα Βιοδυλιστηρίου -----	57
3.2.1	Εκχύλιση αντιοξειδωτικών-----	57
3.2.2	Εκχύλιση πρωτεϊνών-----	60
3.2.3	Υδρόλυση -----	61
3.3	Μικροβιακές Ζυμώσεις -----	63
3.3.1	Υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης-----	63
3.3.2	Υπόστρωμα συνθετικής ξυλόζης-----	64
3.3.3	Υπόστρωμα συνθετικής γαλακτόζης-----	65
3.3.4	Υπόστρωμα συνθετικής μαννόζης -----	66
3.3.5	Υπόστρωμα συνθετικής αραβινόζης -----	66
3.3.6	Υπόστρωμα προερχόμενο από υδρόλυμα απόβλητου λαχανικού -----	67
3.3.7	Υπόστρωμα με εμπορικά σάκχαρα, προσομοιωμένο στα σάκχαρα του απόβλητου -----	69
3.3.8	Σχολιασμός αποτελεσμάτων από αέριο χρωματογράφο (GC) -----	72
3.3.9	Σύγκριση με τη βιβλιογραφία-----	73
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ -----	77
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ -----	78

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ-----

Εικόνα 1.1 Γραφική απεικόνιση ταξινόμησης απόβλητων φρούτων και λαχανικών ανά κατηγορία παραγωγικής διαδικασίας παγκοσμίως	15
Εικόνα 1.2 Συμβολή των διάφορων τύπων φρέσκων λαχανικών στα συνολικά αναπόφευκτα απόβλητα που προκαλούνται από κατανάλωση	15
Εικόνα 1.3 Γραφική απεικόνιση τεχνικών εκχύλισης του μπρόκολου σε ενώσεις που προάγουν την υγεία.....	17
Εικόνα 1.4 Σχηματική απεικόνιση των ενώσεων που προάγουν την υγεία στο μπρόκολο σε μελέτη].....	17
Εικόνα 1.5. Σχηματική απεικόνιση βιολογικών δραστηριοτήτων που προάγουν την υγεία, χάρη στις δραστικές ενώσεις μπρόκολου	18
Εικόνα 1.6 Σχηματική αναπαράσταση μέσου όρου παραγωγής μπροκολου και κουνουπιδιού ανά χώρα (2011-2016)	19
Εικόνα 1.7 Ποσοστό μέσου όρου παραγωγής μπρόκολου και κουνουπιδιού ανά ήπειρο	19
Εικόνα 1.8 Σχηματική απεικόνιση λιγνίνης αποτελούμενη από 16 μόρια.....	22
Εικόνα 1.9 Απεικόνιση αντικτύπου της προεπεξεργασίας στη βιομάζα	22
Εικόνα 1.10 Απεικόνιση του λιγνοκυτταρινούχου περιεχομένου του υδρολύματος μπρόκολου κατά την διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης	24
Εικόνα 1.11 Λιγνοκυτταρινούχα πρώτη ύλη ως βιοδιωλιστήριο	25
Εικόνα 1.12 Η βιοσύνθεση λιπαρών οξέων σε ελαιογόνους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς και η βιοσύνθεση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μέσω του μεταβολισμού α-λινολενικού οξέος (ALA) και λινελαϊκού οξέος (LA)	30
Εικόνα 1.13 Απεικόνιση της συσσώρευσης του ενδοκυτταρικού λίπους στην παρούσα μελέτη, μέσω οπτικού μικροσκοπίου.....	33
Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη	34
Εικόνα 2.2 Απεικόνιση (αριστερά) των προκαλλιιεργειών σε υπόστρωμα PDA και ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα υδρολύματος απόβλητου και συνθετικών σακχάρων (120 h) (δεξιά)	37
Εικόνα 2.3 Απεικόνιση συσκευής πέψης και απόσταξης για την ανάλυση της Kjeldahl, καθώς και τα διαλύματα πριν και μετά την τιτλοδότηση.....	40
Εικόνα 2.4 Εκχύλιση υδατοδιαλυτών συστατικών	41
Εικόνα 2.5 Εκχύλιση Λίπους μέσω soxhlet.....	45

Εικόνα 2.6 Άλεση της βιομάζας προς προσδιορισμό του λίπους.....	51
---	----

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 2.1 Πρότυπη καμπύλη γλυκίνης για τον προσδιορισμό αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων.....	46
Γράφημα 2.2 Πρότυπη καμπύλη K_2HPO_4 για τον προσδιορισμό ανόργανου φωσφόρου.....	47
Γράφημα 2.3 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για τον προσδιορισμό ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	48
Γράφημα 2.4 Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης για τον προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων	50
Γράφημα 3.1 Σύγκριση διαλυτών διαφορετικών αναλογιών ως προς την συγκέντρωση φαινολικών, σε επωαστήρα υπό ανάδευση	58
Γράφημα 3.2 Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών με τη χρήση υπερήχων	60
Γράφημα 3.3 Κατανάλωση γλυκόζης (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (◆) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ)(L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα <i>Cunninghamella echinulata</i> ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας	63
Γράφημα 3.4 Κατανάλωση ξυλόζης (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (◆) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ)(L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα <i>Cunninghamella echinulata</i> ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας	64
Γράφημα 3.5 Κατανάλωση γαλακτόζης (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (◆) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ)(L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα <i>Cunninghamella echinulata</i> ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας	65
Γράφημα 3.6 Κατανάλωση μαννόζης (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (◆) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ)(L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα <i>Cunninghamella echinulata</i> ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας	66

Γράφημα 3.7 Κατανάλωση σακχάρων (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινοομάδων (◆) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ)(L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας με υπόστρωμα προερχόμενο από υδρόλυμα απόβλητου λαχανικού..... 68

Γράφημα 3.8 Κατανάλωση γλυκόζης (◆) (g/L), ξυλόζης (▲) (g/L), γαλακτόζης (○) (g/L), αραβινόζης (Δ) (g/L) και σακχαρόζης (■) (g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας καλλιέργειας με υπόστρωμα προερχόμενο από υδρόλυμα απόβλητου λαχανικού..... 69

Γράφημα 3.9 Κατανάλωση σακχάρων (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινοομάδων (◆) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ) (L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας σε υπόστρωμα με εμπορικά σάκχαρα, προσομοιωμένο στα σάκχαρα του απόβλητου..... 70

Γράφημα 3.10 Κατανάλωση γλυκόζης (◆) (g/L), ξυλόζης(▲) (g/L) και σακχαρόζης (■) (g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας 71

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1 Συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό μέσο.....	36
Πίνακας 3.1 Σύσταση μπρόκολου παρούσας μελέτης και βιβλιογραφίας	54
Πίνακας 3.2 Ανάλυση υδατοδιαλυτών εκχυλισμάτων.....	56
Πίνακας 3.3 Ανάλυση οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων.....	57
Πίνακας 3.4 Συγκέντρωση εκχυλιζόμενων ελεύθερων σακχάρων (g/100g ξηρού).....	59
Πίνακας 3.5: Συγκέντρωση σακχάρων υδρόλυματος μπρόκολου.....	61
Πίνακας 3.6 Προφίλ των λιπαρών οξέων των μικροβιακών ζυμώσεων που διεξήχθησαν με το μυκητιακό στέλεχος <i>Cunninghamella echinulata</i> ATHUM 4411.....	72
Πίνακας 3.7 Στελέχη και υποστρώματα προς παραγωγή λιπαρών οξέων πλούσιων σε γ-λινολενικό οξύαπό την παρούσα μελέτη και την βιβλιογραφία.....	74

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Απόβλητα λαχανικών

Ένα κομμάτι το οποίο αναδύεται σε πολύ μεγάλο βαθμό στο πεδίο της τεχνολογίας και της επιστήμης των τροφίμων είναι η αξιοποίηση των αποβλήτων. Τεράστια ποσά αποβλήτων παράγονται καθημερινά στη βιομηχανία τροφίμων, τα περισσότερα εκ των οποίων περιέχουν υψηλής αξίας βιοενεργές ουσίες, προσεχώς με πολλά υποσχόμενες και ανερχόμενες εφαρμογές [Martins and Ferreira, 2017]

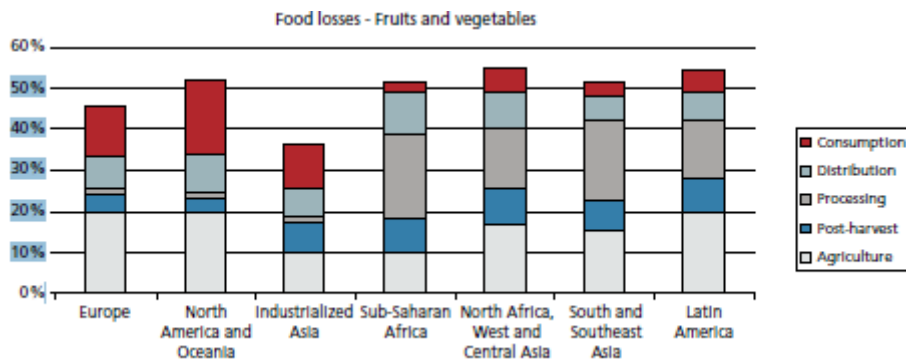
Εκτιμάται ότι το 1/3 των τροφίμων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση παγκοσμίως, χάνεται ή απορρίπτεται και ανέρχεται ετησίως στο 1,3 δισεκατομμύρια τόνους. Για το έτος 2010, τα απόβλητα των λαχανικών στην Ευρώπη ανήλθαν στα 67,9 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε οικιακούς χώρους στο Ηνωμένο Βασίλειο παρατηρήθηκε ότι 6,7 εκατομμύρια τόνοι τροφής απορρίπτονται ετησίως, που αποτελεί το 1/3 των τροφίμων που αγοράζεται (21,7 εκατομμύρια τόνοι). Το μεγαλύτερο μέρος τους, το οποίο μπορεί να αποφευχθεί ανέρχεται στα 4,1 εκατομμύρια τόνους (61 %) [Ventour, 2008]. Επιπρόσθετα, στις ανεπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες παρατηρείται μεγάλη απώλεια τροφίμων, ακόμη και αν είναι ικανά να καταναλωθούν. Εν αντιθέσει, οι υποανάπτυκτες χώρες παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες απώλειες τροφίμων κατά το στάδιο της παραγωγής προς την επεξεργασία [Gustafsson et al., 2011]. Σύμφωνα με αναφορά του FAO τα φρούτα και τα λαχανικά κατέχουν το υψηλότερο ποσοστό απώλειας τροφίμου, που ανέρχεται στο 45 %.

Όσον αφορά στην αλυσίδα εφοδιασμού των λαχανικών, αποτελείται από 5 κατηγορίες και η απωλειά τους εκτιμάται σε κάθε ένα από τα τμήματα της αλυσίδας παρουσιάζεται αναλυτικά.

- Το πρώτο τμήμα αφορά τη γεωργική παραγωγή και οι απώλειες των λαχανικών μπορεί να οφείλονται σε μηχανική βλάβη κατά τη συγκομιδή.
- Δεύτερο τμήμα αποτελεί, η διαχείριση της συγκομιδής και η αποθήκευση, με την απώλεια να ενδέχεται να συμβεί από υποβάθμιση ή κατά τη μεταφορά.
- Τρίτο σκέλος αποτελεί η επεξεργασία, συμπεριλαμβανομένων απωλειών από υποβάθμιση κατά τη βιομηχανική ή οικιακή διαδικασία.

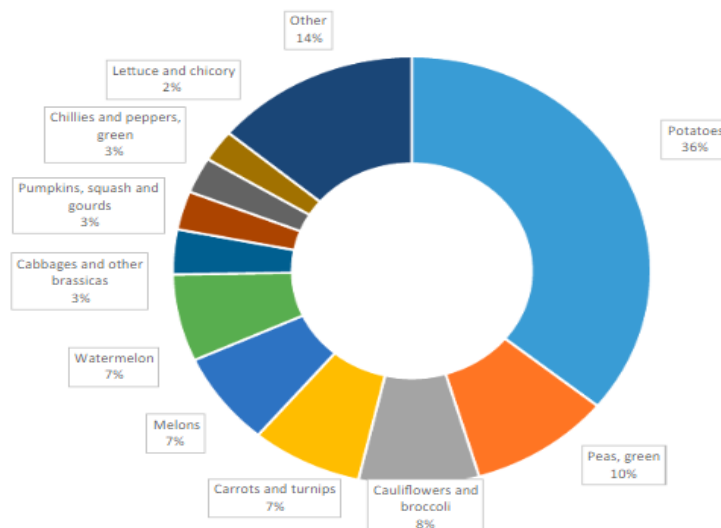
- Τέταρτον, κατά διανομή μπορούν να παρουσιαστούν απώλειες στο σύστημα των αγορών.
- Τέλος, κατά την κατανάλωση σε οικιακό επίπεδο συμπεριλαμβάνονται απώλειες και απόβλητα λαχανικών [Gustafsson et al., 2011].

Με βάση τις συγκεκριμένες κατηγορίες εμφανίζεται στην εικόνα που ακολουθεί, η ταξινόμηση των απόβλητων λαχανικών σε κάθε στάδιο ανά ήπειρο.



Εικόνα 1.1 Γραφική απεικόνιση ταξινόμησης απόβλητων φρούτων και λαχανικών ανά κατηγορία παραγωγικής διαδικασίας παγκοσμίως [Gustafsson et al., 2011]

Από την εικόνα 1.1 παρατηρείται ότι στην Ευρώπη, κατά το στάδιο της γεωργικής παραγωγής και της κατανάλωσης, η απώλεια των λαχανικών ανέρχεται στο υψηλότερο ποσοστό (20 %), εν αντιθέσει με το στάδιο της συγκομιδής και της επεξεργασίας να παρουσιάζουν τα χαμηλότερα (5 %, 2 %, αντίστοιχα).



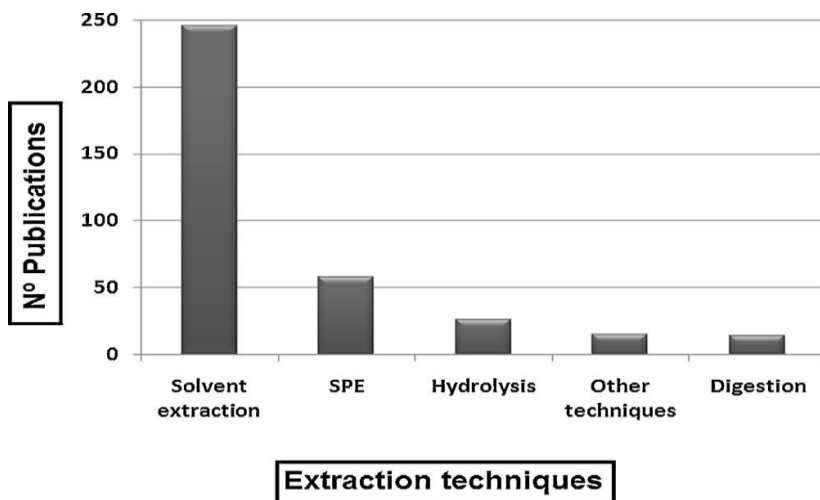
Εικόνα 1.2 Συμβολή των διάφορων τύπων φρέσκων λαχανικών στα συνολικά αναπόφευκτα απόβλητα που προκαλούνται από κατανάλωση [De Laurentiis et al., 2018]

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στα απόβλητα μπρόκολου, ύστερα από μελέτη που διεξήχθη (Εικόνα 1.2), διαπιστώθηκε ότι ανέρχονται σε ποσοστό 10% εκ των οποίων το 1.5-3% οφείλεται στο στάδιο της πώλησης [Terry et al., 2011]

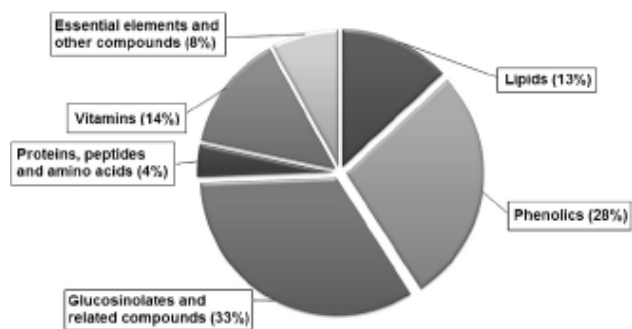
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι το απόβλητο μπρόκολου έναντι άλλων λαχανικών παρουσιάζει την μικρότερη εκπομπή αερίων θερμοκηπίου (0,12 kg CO₂ e/kg) [i Canals, 2008]

1.2 Μπρόκολο

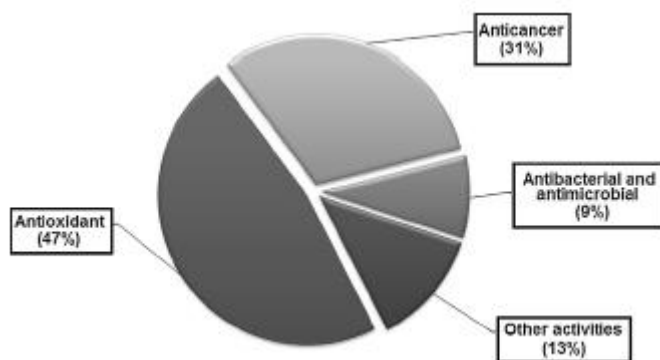
Το μπρόκολο ανήκει στην οικογένεια των σταυρανθών (Cruciferae) λαχανικών, τους γένους *Brassica oleracea* [Jeffery et al., 2003, Campas-Baypoli et al., 2009]. Τα λαχανικά που ανήκουν στην συγκεκριμένη οικογένεια λαχανικών αποτελούν εξαιρετικές πηγές βιοδραστικών φυτοχημικών, οι οποίες παρουσιάζουν θεραπευτικά αποτελέσματα. Η αύξηση κατανάλωσής τους συνίσταται χάρη στις βιοδραστικές τους ενώσεις, οι οποίες μπορούν να ενισχύσουν στην πρόληψη του καρκίνου, καρδιαγγειακών ασθενειών, του διαβήτη, εγκεφαλικού και ισχαιμικού επεισοδίου, καθώς και της οστεοπόρωσης, χάρη στις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές τους [Ares et al., 2013, Moreno et al., 2006]. Παράλληλα, οι συγκεκριμένες ουσίες θεωρούνται πολύ σημαντικές τόσο στη φαρμακοβιομηχανία και στην κοσμητολογία, όσο και στην επιστήμη των τροφίμων [Martins and Ferreira, 2017]. Πιο αναλυτικά, όσον αφορά στην επιστήμη των τροφίμων, προστίθενται ώστε να βελτιώσουν τη θρεπτική λειτουργία των τροφίμων και τη χρώση τους, αλλά προστίθενται και για θεραπευτικούς σκοπούς [Gawlik-Dziki, 2008]. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί η ικανότητα των συγκεκριμένων ουσιών να δρουν τόσο ως αντιοξειδωτικά, όσο και ως ρυθμιστικά ένζυμα καθώς και να ελέγχουν την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο [Vasanthi et al., 2009]



Εικόνα 1.3 Γραφική απεικόνιση τεχνικών εκχύλισης του μπρόκολου σε ενώσεις που προάγουν την υγεία [Ares, Nozal and Bernal, 2013].



Εικόνα 1.4 Σχηματική απεικόνιση των ενώσεων που προάγουν την υγεία στο μπρόκολο σε μελέτη [Ares et al., 2013]

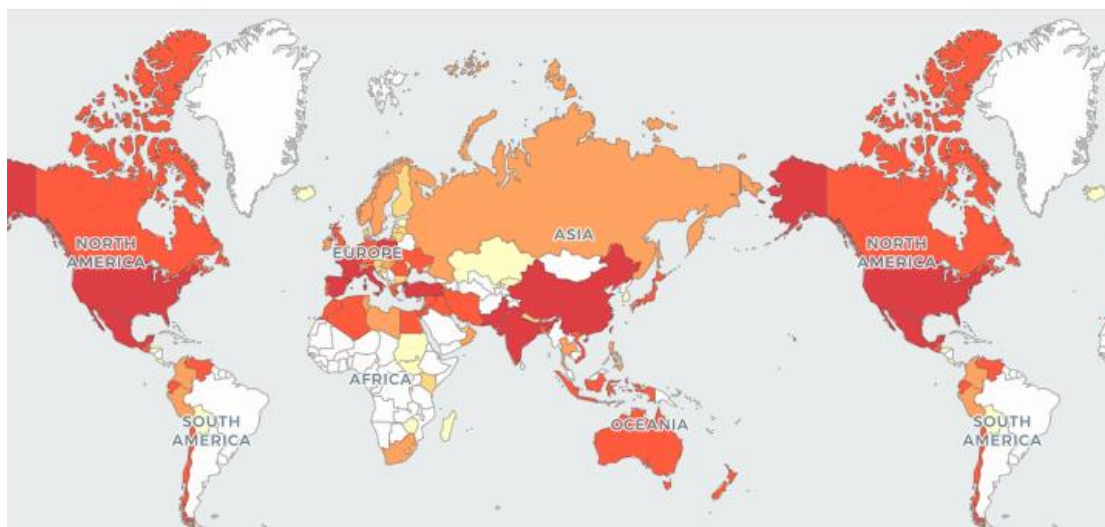


Εικόνα 1.5. Σχηματική απεικόνιση βιολογικών δραστηριοτήτων που προάγουν την υγεία, χάρη στις δραστικές ενώσεις μπρόκολου [Ares et al., 2013]

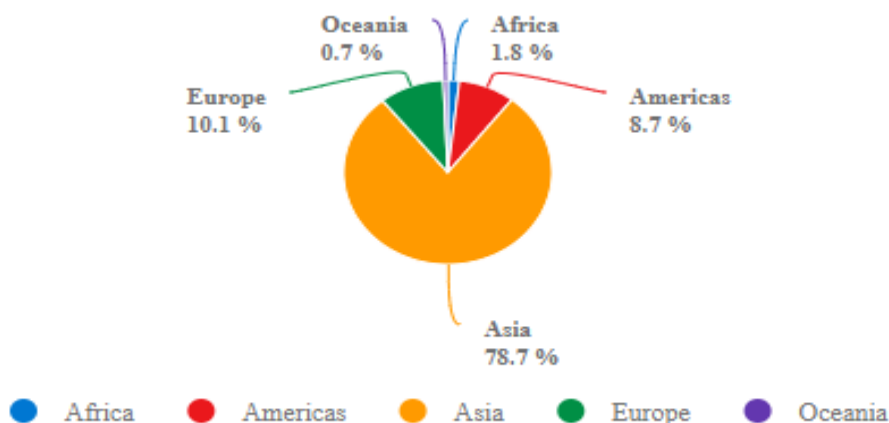
Σύμφωνα με τη μελέτη Ares et al., 2013, (εικόνα 1.3-1.5) που διεξήχθη παρατηρήθηκε ότι οι ενώσεις του μπρόκολου που μελετήθηκαν περισσότερο είναι οι γλυκοζινολικές (33 %) και οι φαινολικές (28 %). Σε μικρότερο ποσοστό μελετήθηκαν οι βιταμίνες, τα λιπίδια, τα ιχθυοστοιχεία, με μικρότερο το ποσοστό των πρωτεϊνών (4 %). Όσον αφορά στις τεχνικές εκχύλισης, η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε περισσότερο ήταν η εκχύλιση με διαλύτη, καθώς η πιο εύχρηστη και η πιο οικονομική μέθοδος. Δεύτερη σε σειρά ακολουθεί η εκχύλιση σε στερεή κατάσταση, ιδιαίτερα σε ανάλυση βιταμινών και γλυκοζινολικών ενώσεων, ενώ τρίτη σε σειρά έρχεται η διαδικασία της υδρόλυσης για την ανάλυση των πρωτεϊνών. Το μπρόκολο έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια, λόγω της εξαιρετικής του σύστασης, το οποίο είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, πρωτεΐνες και βιταμίνες. Τα ευεργετικά του αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε πολλές έρευνες, με το μεγαλύτερο μέρος να επικεντρώνεται στις αντιοξειδωτικές (47 %) και στις αντικαρκινικές του ιδιότητες (31 %).

Επομένως, η εκτενής του μελέτη τα τελευταία έτη βοήθησε ώστε να ενισχυθεί η κατανάλωση του, εξαιτίας της αναγνώρισης των ευεργετικών ιδιοτήτων του στην υγεία του ανθρώπου. Το άνθος, το οποίο αποτελεί το κύριο βρώσιμο μέρος του μπρόκολου, απαρτίζει πάνω από το 70 % του φυτού, ενώ τα φύλλα αποτελούν το μέρος το οποίο απορρίπτεται. Το συγκεκριμένο υποπροϊόν αποτελεί και αυτό πηγή πολύτιμων βιοδραστικών ενώσεων. Το συγκεκριμένο απόβλητο μπορεί να αξιοποιηθεί και ως διατροφικό συμπλήρωμα για τη σίτιση των ζώων, δίνοντας έτσι σημαντική οικονομική αξία. Πλέον, το ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των απόβλητων λαχανικών έχει

αμβλυνθεί, με στόχο τη βιομετατροπή τους σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας [Ares et al., 2013].



Εικόνα 1.6 Σχηματική αναπαράσταση μέσου όρου παραγωγής μπρόκολου και κουνουπιδιού ανά χώρα (2011-2016) (FAOSTAT)



Εικόνα 1.7 Ποσοστό μέσου όρου παραγωγής μπρόκολου και κουνουπιδιού ανά ήπειρο (FAOSTAT)

Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε παγκόσμιο επίπεδο (2011-2016) (εικόνα 1.6-1.7), παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη παραγωγή μπρόκολου και κουνουπιδιού ανά τον κόσμο παρουσιάζεται στην Ασία με ποσοστό 78,7 % , ποσοστό που αντιστοιχεί σε ποσό μεγαλύτερο των 203.399,5 τόνων. Η αμέσως επόμενη ήπειρος σε παραγωγή έρχεται με ποσοστό 8,7 % η κεντρική Αμερική, ενώ τρίτη η Ευρώπη με 10,1 %. Τέλος πολύ μικρό ποσοστό εμφανίζουν η Ωκεανία και η Αφρική με ποσοστό μικρότερο του 2 %. Τέλος, η Κίνα, η Ινδία, οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, η Ισπανία

και το Μεξικό αποτελούν τις χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή. Όλα τα παραπάνω στατιστικά δεδομένα για την παραγωγή των συγκεκριμένων λαχανικών, σε παγκόσμια κλίμακα ελήφθησαν από FAO Statistical Yearbook, 2016.

1.3 Βιοδραστικές ενώσεις

Τα λαχανικά της οικογένειας *Brassicaceae* αποτελούν εξαιρετικές πηγές αντιοξειδωτικών και βιοενεργών φυτοχημικών, εμφανίζοντας αντικαρκινικές [Bhandari and Kwak, 2015], αντιφλεγμονώδεις, αντιγηραντικές καθώς και αντιθρομβωτικές ιδιότητες [Ares et al., 2013]. Οι βιοδραστικές ενώσεις που βρίσκονται σε υψηλό ποσοστό είναι τα καροτενοειδή, οι φαινολικές ενώσεις, τα αλκαλοειδή καθώς και οι χλωροφύλλες [dos Reis et al. 2015]. Οι φαινολικές ενώσεις διαχωρίζονται στα φλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανιδίνες) και στα μη φλαβονοειδή (φαινολικά οξέα, στυλβένιο) [Ares et al., 2013]. Στην πρώτη κατηγορία μπορούν να συμπεριληφθούν οι φλαβονόλες όπως οι κβερκετίνη, καμφερολίνη, μυριστίνη και ρουτίνη (quercetin, kaempferol, myricetin and rutin) [Gawlik-Dziki, 2008, Campas-Baypoli et al., 2009], αλλά και φλαβόνες όπως κατεχίνες και επικατεχίνες [Fernandes et al., 2017]. Τα φλαβονοειδή και τα παράγωγά τους απαρτίζουν τη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινόλων ιδανική για να εξουδετερώσει τις υπεροξυλικές ρίζες [Bhandari and Kwak, 2015]. Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ποικίλους διαλύτες, χρόνους, θερμοκρασίες και μεθόδους. Οι διαλύτες των οποίων η χρήση είναι πιο συχνή, είναι η μεθανόλη και οι μεθανολικοί διαλύτες, η αιθανόλη, η ακετόνη, η ισοπροπανόλη αλλά και το νερό [Fernandes et al., 2017, Ares et al., 2013].

1.4 Πρωτεΐνες

Η κατανάλωση των πρωτεϊνών, των πεπτιδίων και των αμινοξέων προσφέρει σημαντικά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία, πέρα από το ότι παρέχει αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [Ares et al., 2013]. Ακόμη, μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί ώστε να διαπιστωθεί η δράση του στην πρόληψη του διαβήτη και της υπέρτασης. Τα φύλλα των λαχανικών της οικογένειας *Brassicaceae* είναι πλούσια σε πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική πηγή πρωτεΐνης, αλλά αξιοποιηθεί στην παραγωγή ζωοτροφών καθώς και στην επεξεργασία τροφίμων [Xu et al., 2017].

Οι πρωτεΐνες, διαλυτές και αδιάλυτες μπορούν να εξαχθούν με ποικίλους διαλύτες, όπως το τριχλωροοξικόξύ ή ακόμη και με ρυθμιστικά διαλύματα. Σε αντίθεση, οι ακατέργαστες πρωτεΐνες λαμβάνονται μέσω όξινης πέψης, καταλυόμενης από μίγμα σεληνίου [Ares et al., 2013].

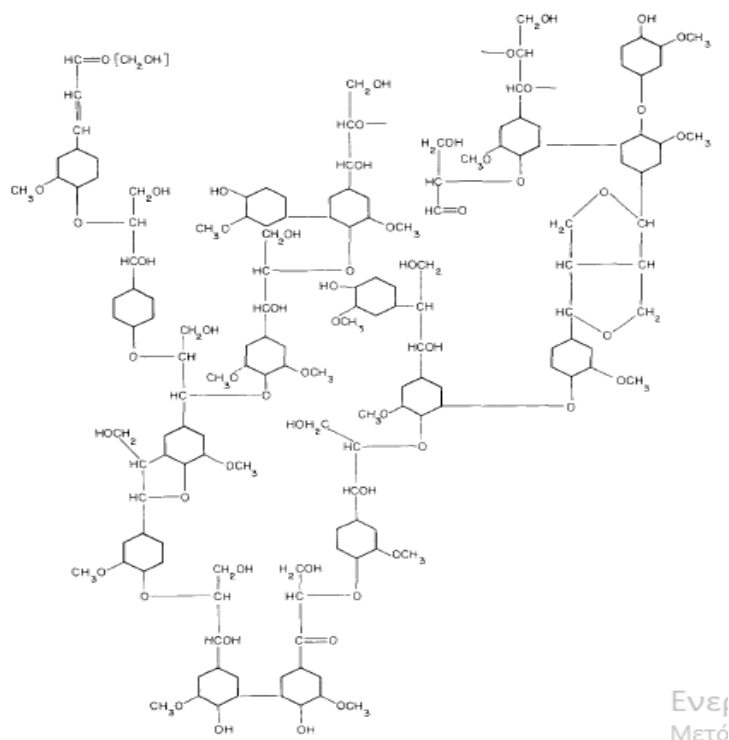
1.5 Δομή βιομάζας των λαχανικών

Το κυτταρικό τοίχωμα των λαχανικών αποτελείται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνη, νερό και σε μικρότερο ποσοστό δομικές γλυκοπρωτεΐνες, φαινολικούς εστέρες, μέταλλα και ένζυμα [Houben et al., 2011]. Τα κυτταρικά απόβλητα από υπολείμματα καλλιεργειών περιέχουν 31-60 % κυτταρίνη, 11-38 % πεντόζες και 12-28 % λιγνίνη [Das and Singh, 2004].

Η ημικυτταρίνη αποτελεί μια ομάδα σύνθετων πολυσακχαριτών που συνδέονται μεταξύ τους με β-D (1→4)-γλυκοσιδικό δεσμό. Δεσμεύονται ισχυρά στην επιφάνεια της κυτταρίνης το οποίο έχει ως αποτέλεσμα να απομακρυνθούν από τα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων μόνο με ισχυρές βάσεις. Οι ημικυτταρίνες περιλαμβάνουν ξυλογλουκάνη, ξυλάνη (συμπεριλαμβανομένης γλυκουρονοξυλάνης, αραβινοξυλάνης, γλυκουρονοαραβοξυλάνης) και μαννάνες (συμπεριλαμβανομένης γλυκομαννάνης, γαλακτομαννάνης και γαλακτογλυκομαννάνης) [Houben et al., 2011, Chandel et al., 2012].

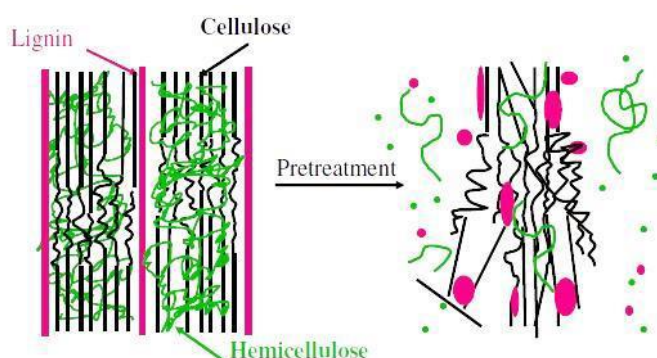
Η κυτταρίνη, ο πιο κοινός πολυσακχαρίτης που συναντάται στη φύση [Chandel et al., 2012], αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες σελοβιόζης. Ορίζεται ως ένα γραμμικό πολυμερές γλουκάνης, των D-γλυκοπυρανοζικών μονάδων, συνδεδεμένων με β-(1→4) γλυκοσιδικούς δεσμούς. Παρουσιάζει υδροφοβικό προφίλ εξαιτίας των αξονικών αλειφατικών υδρογόνων, στην κορυφή των μονομερών μονάδων γλυκόζης, όμως με τις κατάλληλες συνθήκες υδρόλυσης, επιτυγχάνεται η απελευθέρωση μορίων γλυκόζης. [Das and Singh, 2004, Wyman et al., 2005].

Εν αντιθέσει, η λιγνίνη (Εικόνα 1.8) αποτελεί ένα σύμπλοκο 3D πολυμερούς, φαινολικής και ενολικής προέλευσης. Είναι ετερογενή και διακλαδισμένα πολυμερή αόριστης δομής και μεγέθους [Das and Singh, 2004].



Ενεξ
Μετό

Εικόνα 1.8 Σχηματική απεικόνιση λυγνίνης αποτελούμενη από 16 μόρια [Bisaria and Ghose, 1981]



Εικόνα 1.9 Απεικόνιση αντικτύπου της προεπεξεργασίας στη βιομάζα [Taylor et al., 2015]

Τόσο τα κλάσματα της κυτταρίνης όσο και της ημικυτταρίνης είναι πολυμερή, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δυνητικές πηγές σακχάρων σε ζυμώσεις ή να χρησιμοποιηθούν ως προς την μετατροπή των σακχάρων σε προϊόντα. Η υδρόλυση τους μπορεί να είναι όξινη, αλκαλική είτε ενζυμική. Η ημικυτταρίνη μπορεί να υδρολυθεί κάτω από ήπιες συνθήκες όξινες ή αλκαλικές αλλά και εναλλακτικά, με ημικυτταρινούχα ένζυμα. Σε μια όξινη υδρόλυση τα οξέα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το υδροχλωρικό, το θειϊκό, το νιτρικό και το υδροφθορικό. Το

κλάσμα της κυτταρίνης είναι πιο ανθεκτικό, με αποτέλεσμα να απαιτεί πιο αυστηρή προεπεξεργασία. Μείζονος σημασίας είναι η θερμοκρασία, η οποία παρουσιάζει εύρος 140-260 °C. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες κίνδυνο αποτελεί η ταχεία μετατροπή της ημικυτταρίνης σε φουρφουράλη και της κυτταρίνης σε υδροξυ-μεθυλ-φουρφουράλη (HMF). Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες 100-120 °C ο κίνδυνος έγκειται στην συγκέντρωση του οξέος. Οι ενώσεις αυτές που δημιουργούνται κατά την όξινη υδρόλυση των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων, παρουσιάζουν παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Επομένως, πριν τη ζύμωση, για την παραγωγή κάποιου προϊόντος, συνήθως απαιτείται μια προεπεξεργασία του υποστρώματος με σκοπό να αφαιρεθεί η μεγαλύτερη ποσότητα παρεμποδιστών [Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000].

Η προεπεξεργασία αποτελεί κρίσιμο βήμα της διαδικασίας για την βιοχημική μετατροπή της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας (Εικόνα 1.9). Η αλλαγή της δομής της κυτταρίνης είναι απαραίτητη, καθώς πρέπει να είναι πιο προσβάσιμη από τα ένζυμα τα οποία θα μετατρέψουν τα υδατανθρακικά πολυμερή σε σάκχαρα προς ζύμωση. Μετά την αρχική επεξεργασία της βιομάζας με άλεση, η παραγωγή των σακχάρων προσεγγίζεται σε 2 στάδια. Πρώτο στάδιο αποτελεί η προεπεξεργασία απολιγνοποίησης ώστε η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη να απελευθερωθούν από το σύμπλοκό τους και να γίνουν πιο προσβάσιμες. Δεύτερο στάδιο αποτελεί η υδρόλυση των πολυμερών με στόχο να παραχθούν ελεύθερα σάκχαρα. Η απολιγνοποίηση της βιομάζας αποτελεί τεχνικά το πιο δύσκολο κομμάτι [Taylor et al., 2015]. Στην Εικόνα 1.10 απεικονίζεται το λιγνοκυτταρινούχο περιεχόμενο του υδρολύματος του μπρόκολου κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης.

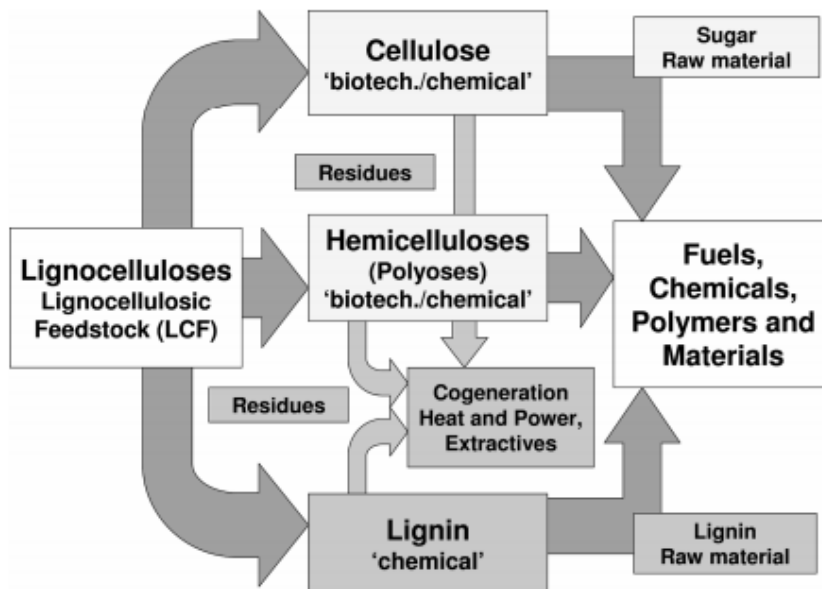
Τα τεχνικά εμπόδια που υπάρχουν πέρα από πιθανό μη διαχωρισμό λιγνίνης και κυτταρίνης (προβλήματα υδρόλυσης σε επόμενο στάδιο) είναι ο σχηματισμός παραπροϊόντων που μπορούν να αναστείλουν τη ζύμωση, η υψηλή χρήση χημικών ουσιών, το υψηλό ενζυμικό κόστος καθώς και το υψηλός κόστος κεφαλαίου για τις εγκαταστάσεις προεπεξεργασίας [Taylor et al., 2015].



Εικόνα 1.10 Απεικόνιση του λιγνοκυτταρινούχου περιεχομένου του υδρολύματος μπρόκολου κατά την διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης (παρούσα μελέτη)

1.6 Βιοδυλιστήριο

Με τον όρο πράσινο βιοδυλιστήριο παρουσιάζονται σύνθετα συστήματα, βιώσιμα, φιλικά ως προς το περιβάλλον για την ολιστική αξιοποίηση υλικών και ενέργειας, σε συνδυασμό με την εκμετάλλευση πρώτων υλών υπό τη μορφή βιομάζας, από μια στοχευμένη βιώσιμη αξιοποίηση γης. Με τον όρο “βιομηχανική βιομάζα” αναφέρεται κάθε οργανική ύλη η οποία είναι διαθέσιμη ως ανανεώσιμη ή επαναλαμβανόμενη βάση, συμπεριλαμβανομένων αποβλήτων επεξεργασίας τροφίμων, γεωργικά τρόφιμα και υπολείμματα ζωοτροφών ώστε να αξιοποιηθούν σε βιομηχανικές χρήσεις [Kamm et al., 2010]. Πιο αναλυτικά, κατά την διαδικασία της βιοδύλισης οι ανανεώσιμες πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται μπορούν να μετατραπούν τόσο σε βιοκαύσιμα όσο και σε βιοδιασπώμενα πλαστικά (Εικόνα 1.11). Στόχος είναι η εκμετάλλευση ενός φάσματος οργανικών μακρομορίων (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, έλαια, λιγνίνη) καθώς και πολλών άλλων χημικών συστατικών όπως αντιοξειδωτικά, λειτουργικές πρωτεΐνες και λιπίδια. Φθηνές πρώτες ύλες είναι κομβικής σημασίας για να μετατραπούν σε ένα αξιοποιήσιμο προϊόν. Καθώς στις περισσότερες βιοδιεργασίες χρησιμοποιείται η γλυκόζη ως πρώτη ύλη, έχουν προταθεί τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά ως βιομάζα για βιοδύλιση, τα οποία βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες κυρίως σε αγροτοβιομηχανικά απόβλητα [Koutinas et al., 2007].



Εικόνα 1.11 Λιγνοκυτταρινούχα πρώτη ύλη ως βιοδιυλιστήριο [Kamm et al., 2010]

1.7 Αξιοποίηση αποβλήτων λαχανικών για την παραγωγή προϊόντων μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων

Λόγω της μεγάλης ποσότητας απόβλητων λαχανικών ανά τον κόσμο, καθώς και λόγω των βιοχημικών χαρακτηριστικών τους, έχουν διεξαχθεί μελέτες για την μετατροπή των αποβλήτων σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Μέσω της αναερόβιας πέψης προσφέρονται περιβαλλοντικά και οικονομικά πλεονεκτήματα ως μια βιώσιμη προσέγγιση για την επεξεργασία στερεών αποβλήτων. Η υδρόλυση και η οξεογένεση, γνωστή ως ζύμωση, είναι το πρώτο βήμα στην αναερόβια μικροβιακή μετατροπή των οργανικών αποβλήτων με σκοπό την παραγωγή προϊόντων όπως ένζυμα, οργανικά οξέα, αρωματικές ενώσεις, χρωστικές τροφίμων, βιοαιθανόλη, βιομεθάνιο [Ye et al., 2007, Koutinas et al., 2014]. Ερευνητές έχουν αναπτύξει γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς, ενσωματώνοντας γονίδια για την παραγωγή των μεταβολιτών [Panda et al., 2016].

Παράλληλα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι φυτικά έλαια όπως ηλιέλαιο και σογιέλαιο μπορούν να δράσουν ως φθηνές και αποτελεσματικές πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών όπως γλυκολιπιδίων, από διάφορους μικροοργανισμούς [Mukherjee et al., 2006]. Τέλος, υδρολύματα τομάτας έχουν μελετηθεί ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων πλούσιων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με τη χρήση του μυκητιακού στελέχους *Cunninghamella echinulata* [S. Fakas et al., 2007].

1.8 Λιπαρά Οξέα

Τα λιπαρά οξέα, ελεύθερα και ως μέρος συμπλέγματος λιπιδίων, έχουν ρόλο κλειδί στην διαδικασία του μεταβολισμού, καθώς αποτελούν το σημαντικότερο μέσο (αποθήκευσης και μεταφοράς ενέργειας) και αποτελούν βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και ρυθμιστές γονιδίων. Τα λιπαρά οξέα είναι ανθρακικές αλυσίδες που αποτελούνται από μια μεθυλομάδα στο ένα άκρο και μια καρβοξυλομάδα στο άλλο άκρο. Τα λιπαρά οξέα με άρτιο αριθμό ανθράκων χωρίζονται σε 2 κατηγορίες τα κορεσμένα και τα ακόρεστα (ένα, δύο ή παραπάνω διπλούς δεσμούς). Τα σημαντικότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι το βουτυρικό (C_4), παλμιτικό (C_{16}) και στεατικό (C_{18}). Τα μονοακόρεστα περιλαμβάνουν ένα διπλό δεσμό με μήκος αλυσίδας 16-22 άτομα άνθρακα. Τα κυριότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι το παλμιτελαϊκό οξύ ($C_{16}:1, \omega-7$), το ελαϊκό οξύ ($C_{18}:1, \omega-9$), το λινελαϊκό οξύ ($C_{18}:2, \omega-6$) και το λινολενικό οξύ ($C_{18}:3, \omega-6$). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs-polyunsaturated fatty acids) που εμφανίζουν πρώτο διπλό δεσμό μεταξύ 3^{ου} και 4^{ου} άνθρακα, 6^{ου} και 7^{ου} ατόμου άνθρακα ονομάζονται $\omega-3$ και $\omega-6$ λιπαρά οξέα αντίστοιχα. Από τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFAs-monounsaturated fatty acids), το ελαϊκό οξύ είναι το πιο ευρέως διαδεδομένο, όπου απαντάται σε όλα τα λιπαρά σώματα των τροφίμων και είναι το κύριο συστατικό των φυτικών ελαίων (π.χ. του ελαιόλαδου). Από PUFAs, πιο διαδεδομένα είναι τα $\omega-3$ και τα $\omega-6$ λιπαρά οξέα. Τα PUFAs είναι γνωστά και ως απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFAs, essential fatty acids), διότι δεν μπορούν να συντεθούν στον ανθρώπινο οργανισμό και η λήψη τους γίνεται μέσω τροφίμων [Certik and Shimizu, 1999]. Τα πολυακόρεστα τα οποία παράγονται μόνο από φυτά και φυτοπλαγκτόν είναι απαραίτητα σε όλους τους ανώτερους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων θηλαστικών και ψαριών.

1.9 Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (SCO) μέσω μικροβιακών ζυμώσεων

Όλοι οι μικροοργανισμοί δύνανται να συνθέσουν ενδοκυτταρικό λίπος για συγκεκριμένη λειτουργία των δομών της μεμβράνης τους. Ορισμένοι μικροοργανισμοί στο μικροβιακό βασίλειο συσσωρεύουν πάνω από το 20 % της ξηρής βιομάζας τους, λιπίδια στα κυττάρά τους. Φτάνοντας έως και στο 70 %, οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί ονομάζονται ελαιογόνοι και αποθηκεύουν τα λιπίδια σε καινοτόπια ελαίου στην μορφή τριγλυκεριδίων [Ratledge, 2004]. Κάποια από αυτά τα μικροβιακά

λιπίδια, είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Τα PUFAs παρουσιάζουν τεράστια αξία καθώς έχουν τόσο εμπορικό ενδιαφέρον όσο και μεγάλη διατροφική σημασία. Στην τάξη των ζυγομυκήτων ανήκουν οι μικροοργανισμοί που δύνανται να παράξουν λιπίδια πλούσια σε γ -λινολενικό οξύ (GLA) λιπίδια [Chatzifragkou et al., 2010].

1.10 γ -λινολενικό οξύ (GLA, *cis*-6,9,12-octadecatrienoic acid)

Το γ -λινολενικό οξύ (GLA, *cis*-6,9,12-octadecatrienoic acid), το οποίο αποτελεί μεταβολίτη του λινελαϊκού οξέος (18:2, ω -6 λιπαρά), εμφανίζεται να αποτελεί το πιο αποτελεσματικό ω -6 λιπαρό οξύ από αυτά του λινολεϊκού οξέος [Chen and Liu, 1997]. Επιπροσθέτως, αποτελεί πρόδρομο μόριο για την παραγωγή των προσταγλανδινών, ένα εικοσανοειδές το οποίο είναι πλούσιο σε αντιφλεγμονώδεις και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες [Pacht et al., 2003]. Πρωτογενείς πηγές του GLA αποτελεί το έλαιο των σπόρων ηράνθεμου (9 %), το έλαιο του βοτάνου μποράντζα (21%), το έλαιο των σπόρων μαύρης σταφίδας (18 %) καθώς και το έλαιο σπόρων κάνναβης και σπιρουλίνας [Chen and Chang, 1996, Sergeant et al., 2016]. Η παραγωγή GLA από τους σπόρους φυτών επηρεάζεται από την περιοχή, το κλίμα και τις εποχές με αποτέλεσμα να ποικίλει η ποιότητα και η ποσότητα του ελαίου. Παρόλα αυτά, η αυξανόμενη ζήτηση του γ -λινολεϊκού οξέος στην αγορά σε συνδυασμό με την ανεπαρκή προσφορά γεωργικών και ζωικών πηγών, οδήγησε στην βιοτεχνολογική παραγωγή του, χρησιμοποιώντας κατάλληλους μικροοργανισμούς ικανούς να το παράξουν σε υψηλές συγκεντρώσεις έως και 24%. Οι νηματώδεις μύκητες του γένους *Zygomycota* μπορούν να συσσωρεύσουν σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικούς λίπους πλούσιων σε GLA. [Čertík et al., 2012].

Τα ω -6 λιπαρά προέρχονται από φυτικά έλαια και όσον αφορά στα ζώα, σε αυτά παρέχεται μέσω της διατροφής τους. Επιπλέον, έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην καλή λειτουργία του μεταβολισμού αλλά και στο ανοσολογικό και καρδιαγγειακό σύστημα. Πιο αναλυτικά, μπορούν να μειώσουν την αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων, να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και να μειώσουν τελικώς την αρτηριακή πίεση. Σημαντικός είναι ο ρόλος τους και για την εμβρυική ανάπτυξη, επηρεάζοντας κυρίως το νευρικό σύστημα, την οξύτητα και τη νοητική λειτουργία. Η ελλειψή τους μπορεί να προκαλέσει φλεγμονές στο δέρμα, με καθυστέρηση επούλωσης του τραύματος. Επιπλέον,

ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι μεταβολικές του επιδράσεις καθώς η μετατροπή του σε διόμο-γ-λινολενικό οξύ (DGLA, C20:3, ω-6), του προσφέρει το πλεονέκτημα να μπορεί να καταστείλει τη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων (λιπιδίων υπεύθυνων για φλεγμονή) καθώς και μπορεί να μεταβολίζεται άμεσα σε προσταγλανδίνη [Pontes-Arruda et al., 2006]. Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, επικεντρώνεται στις αντικαρκινικές ιδιοτητές τους [Fakas et al., 2007].

1.11 Εφαρμογές GLA

Το GLA παρουσιάζει πολυάριθμες εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων ως συμπληρώμα διατροφής και λειτουργικά τρόφιμα, στην κοσμητολογία στη διαμόρφωση καλλυντικών βασισμένα σε φυσικά συστατικά, στη φαρμακευτική [Fakas et al., 2009] αλλά και στον ιατρικό τομέα. Πιο συγκεκριμένα, η επαρκής πρόσληψη γ-λινολενικού οξέος πρέπει να αποτελεί το 2 % της συνολικής ενέργειας καθώς με βάση έρευνες που διεξήχθησαν, το 0,2-0,3 % της ενέργειας πρέπει να προέρχεται από προκατασκευασμένα μακρυνά αλυσίδας λιπαρά οξέα, με στόχο να αποφευχθούν συμπτώματα ανεπάρκειας. Επιπλέον, στη βιομηχανία τροφίμων η προσθήκη GLA επιτυγχάνεται απευθείας μέσω εδώδιμων μικροοργανισμών που παράγουν PUFAs σε τρόφιμα, είτε μέσω προσθήκης ως έλαιο είτε ως γαλάκτωμα και τέλος μέσω ζωοτροφών πλούσιων σε PUFAs. Παράλληλα, τα λιπαρά οξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως αδρανή συστατικά για την παρασκευή φαρμάκων. Τα φαρμακευτικά σκευάσματα στα οποία χρησιμοποιούνται καταπολεμούν παθολογικές καταστάσεις όπως ρευματοειδής αρθροίτιδα, σκλήρυνση κατά πλάκα και κυρίως ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνου [Chatzifragkou et al., 2010].

1.12 Μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης μικροβιακών λιπιδίων σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς

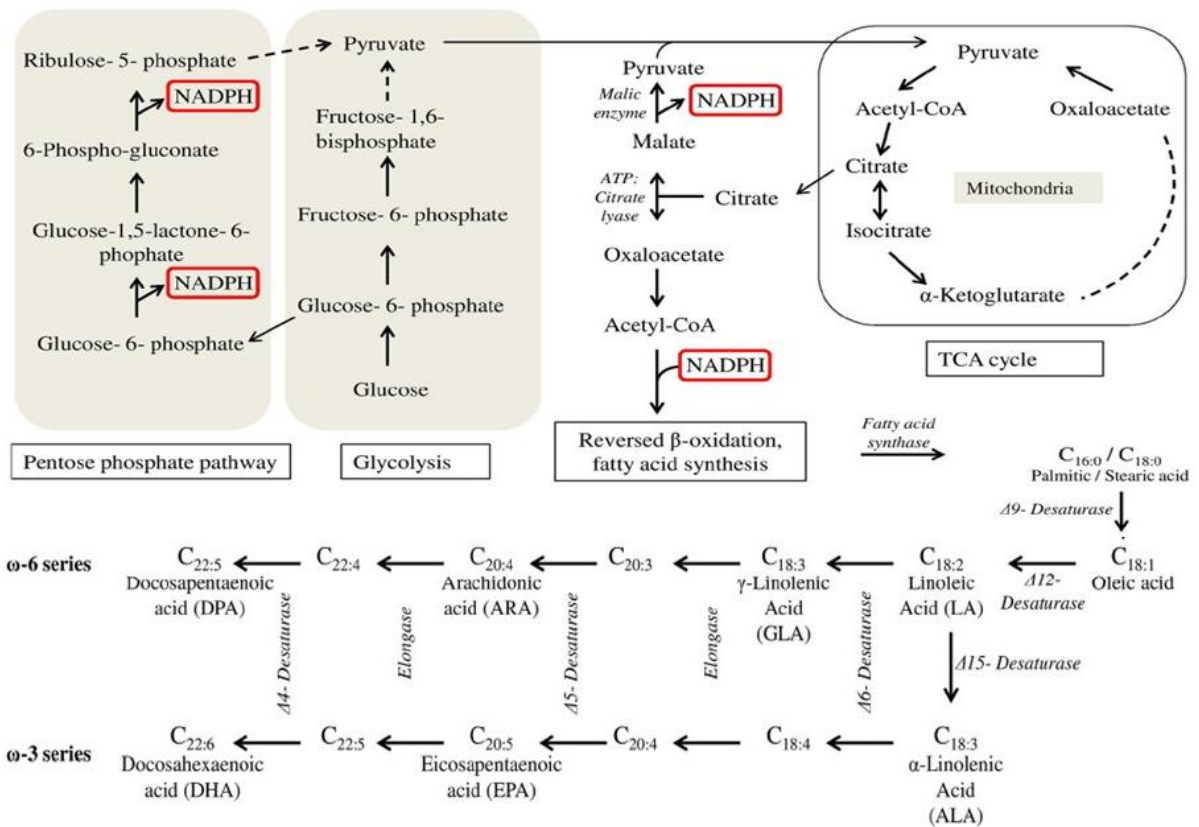
Για την παραγωγή SCO, η συσσώρευση λίπους στα μικροβιακά κύτταρα (de novo συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους) ενεργοποιείται με εξάντληση του αζώτου στο μέσο ανάπτυξης, επιτρέποντας την μετατροπή των σακχάρων σε λιπίδια [Ratledge, 1994; Papanikolaou and Aggelis 2011a]. Εν αντιθέσει με την ανάπτυξη που πραγματοποιείται σε υδρόφοβες πηγές άνθρακα (λίπη, έλαια), η συσσώρευση των λιπιδίων (ex novo συσσώρευση λιπιδίων) αποτελεί πρωτογενή αναβολική διαδικασία, η

οποία πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την παραγωγή ουσιών ελεύθερων λιπιδίων, ανεξαρτητα από την εξάντληση πηγής αζώτου στο μέσο [Fickers et al., 2005].

Η de novo συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον λόγω της δυνατότητας μετασηματισμού άφθονων ανανεώσιμων πηγών (απόβλητα γλυκερόλης, υδρόλυμα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης) σε SCO. Παράλληλα, η ex novo διαδικασία στοχεύει στην παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας σε χαμηλού κόστους λιπαρά οξέα (βούτυρο κακάο καθώς και υποκατάστατα άλλων εξωτικών ελαίων) [Papanikolaou and Aggelis 2010].

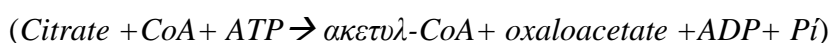
Πιο αναλυτικά, η de novo σύνθεση λιπιδίων αποτελεί μια αναβολική βιοχημική διεργασία κατά την οποία όπως παρατηρείται από την Εικόνα 1.12, μέσω αντίστροφων αντιδράσεων της β-οξειδωσης, το Acetyl-coA οδηγεί στην σύνθεση λιπιδίων. Στη συνέχεια, τα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται για την παραγωγή είτε δομικών λιπιδίων (σφιγγολιπίδια, φωσφολιπίδια), είτε αποθηκευτικών λιπιδίων (τριγλυκερίδια-TAGs) [Ratledge, 1994; Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2009]

Οι λόγοι στους οποίους οφείλεται η παραγωγή ελαίου είναι δύο. Πρώτον, η ικανότητα να παράγει διαρκώς ακετυλ-CoA απευθείας στο κυτοσόλιο του κυττάρου, το οποίο είναι απαραίτητο για την σύνθεση των λιπαρών οξέων και δεύτερον να έχει μια ικανοποιητική παροχή σε NADPH, το οποίο αποτελεί το πιο αναγωγικό μέσο για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.



Εικόνα 1.12 Η βιοσύνθεση λιπαρών οξέων σε ελαιογόνους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς [Ochsenreither et al., 2016] και η βιοσύνθεση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μέσω του μεταβολισμού α-λινολενικού οξέος (ALA) και λινελαϊκού οξέος (LA)

Ο ορισμός του μηχανισμού συσσώρευσης λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, βασίζεται στην κατοχή ενός από τα πιο βασικά ένζυμα λιπογένεσης, ATP:κιτρική λυάση ACL, το οποίο παρέχει ακετυλ-CoA και οξαλοξικό οξύ μέσω αποκοπής του κιτρικού άλατος. Παράλληλα, το ακετυλ-CoA μετατρέπεται μέσω αντίστροφων αντιδράσεων β οξειδωσης σε λιπαρά οξέα. Το συγκεκριμένο ένζυμο δεν βρίσκεται στην πλειονότητα των μη ελαιογόνων μικροοργανισμών. Μικροοργανισμοί χωρίς το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζουν αδυναμία να επιτύχουν τον ίδιο βαθμό συσσώρευσης λιπιδίων, συγκριτικά με αυτούς που το κατέχουν.

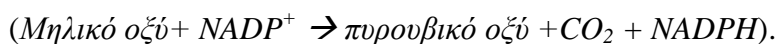


Για να λειτουργήσει ικανοποιητικά το υπόστρωμα, το κιτρικό οξύ, πρέπει να είναι άμεσα διαθέσιμο στο κυτοσόλιο του κυττάρου, όπου θα πραγματοποιηθεί η σύνθεση των λιπαρών οξέων. Η παραγωγή του κιτρικού οξέος συντίθεται ως μέρος του

τρικαρβοξυλικού κύκλου μέσα στο μιτοχόνδριο καθώς οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί είναι ευκαρυώτες. Η συσσώρευση του κιτρικού οξέος οφείλεται στην ενεργότητα της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης, μέρους του κύκλου του Krebs (TCA) που είναι εξαρτώμενη από την παρουσία του AMP (μονοφωσφορικής αδενοσίνης). Μέσω της ενεργότητας του ενζύμου AMP-απαμινάσης γίνεται η διάσπαση του AMP σε IMP (μονοφωσφορική ινοσίνη) και αμμωνία.



Αυτό έχει ως αποτέλεσμα πρώτον, να μειώνεται απότομα η διαθέσιμη ποσότητα AMP καθώς και η ποσότητα του αζώτου να είναι περιορισμένη κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του μικροοργανισμού, και δεύτερον να περιορίζεται η δράση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης, μεταβάλλοντας τη λειτουργία του κύκλου του Krebs. Στη συνέχεια, η μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω ενός αποτελεσματικού συστήματος εκροής (μετατροπή κιτρικού/μηλικό οξύ) δίνει τη δυνατότητα εξαγωγής του κιτρικού άλατος στο κυτταρόπλασμα όπου μαζί με το ACL, παρέχει ακετυλ-CoA, απαραίτητο για την σύνθεση λιπαρών οξέων. Ο σημαντικότερος προμηθευτής NADPH για την βιοσύνθεση λιπαρών οξέων θεωρείται το μηλικό ένζυμο.



Η ενεργότητα του μηλικού ενζύμου παρατηρείται στους περισσότερους ελαιογόνους ζυμομύκητες αλλά και μύκητες, όπου παρέχει ένα ολοκληρωμένο μεταβολικό σύμπλεγμα σε συνδυασμό με το ACL και την συνθάση λιπαρών οξέων (FAS), ώστε να εξασφαλίσει διάυλο επικοινωνίας κατά τη μετατροπή του ακετυλ-CoA σε λιπαρά οξέα. Ακόμη η οξειδωση του ισοκιτρικού άλατος από NADP-ισοκιτρική αφυδρογονάση (NADP-ICD) μπορεί να παράξει NADPH για την συσσώρευση των οξέων. Πέρα όμως από αυτή τη δυνατότητα, έχουν και τη δυνατότητα αποκορεσμού των λιπαρών οξέων. Τέλος, τα λιπαρά οξέα μέσω της εστεροποίησης με γλυκερόλη μετατρέπονται σε τριγλυκερίδια, τα οποία ενσωματώνονται σε σταγονίδια λιπαρών οξέων μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου.

Παρότι, η λιπογένεση περιλαμβάνει όλα τα μεταβολικά στάδια από γλυκόζη σε τριγλυκερίδια, η μεγαλύτερη προσοχή επικεντρώνεται στα ένζυμα που καταλύουν τα 2 πρόδρομα άτομα άνθρακα. Τα συγκεκριμένα άτομα άνθρακα είναι απαραίτητα για την σύνθεση των λιπαρών οξέων αλλά είναι απαραίτητα και στα βοηθητικά συστήματα

παροχής NADPH. Η φύση και η συγκέντρωση του αζώτου που χρησιμοποιείται στο μέσο αποτελεί ένα βασικό παράγοντα λιπογένεσης [Ratledge, 2004, Certik and Shimizu, 1999].

1.13 Βιογένεση των απαραίτητων λιπαρών οξέων

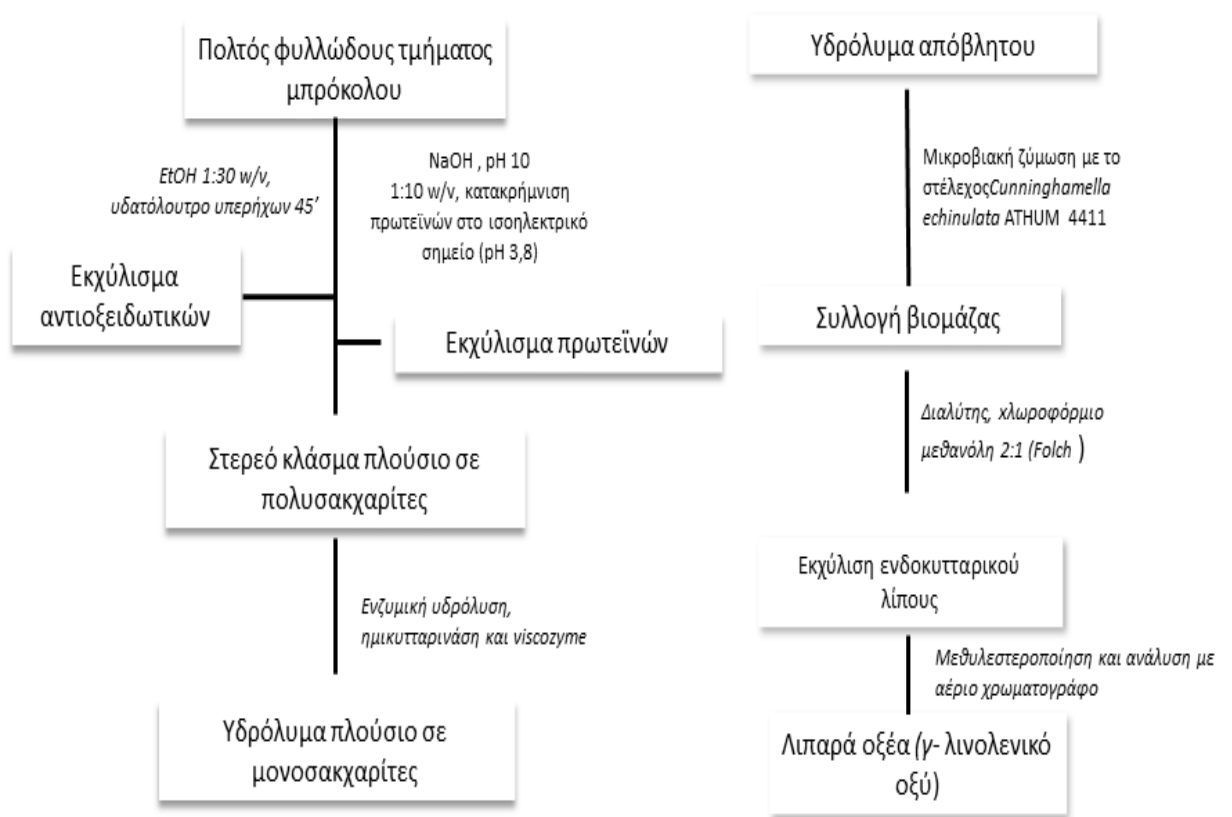
Η βιογένεση των απαραίτητων λιπαρών οξέων (Εικόνα 1.13) ξεκινάει με το λινελαϊκό οξύ (LA) στην περίπτωση των ω-6 λιπαρών οξέων και το α-λινολενικό οξύ (ALA) στην κατηγορία των ω-3 λιπαρών οξέων, ακολουθούμενα από αντιδράσεις αποκορεσμού και επιμήκυνσης. Πιο αναλυτικά, το μονοπάτι του LA (C18:2, ω-6), ξεκινά με την προσθήκη διπλού δεσμού από τον αποκορεσμό του Δ⁶ με αποτέλεσμα την παραγωγή γ-λινολενικού οξέος (GLA, C18:3, ω-6). Με επιμήκυνση της αλυσίδας, προσθέτοντας 2 άτομα άνθρακα, παράγεται το διομο-γ-λινολενικό οξύ (DGLA), το οποίο μετατρέπεται σε αραχιδονικό οξύ (AA C20:4, ω-6) με την προσθήκη διπλού δεσμού στον Δ⁵ [Bellou et al., 2016]. Ακόμη, το α-λινολενικό οξύ (C18:3, ω-3), το οποίο εντοπίζεται σε ανώτερα φυτά όπως σογιέλαιο, ελαιοκράμβη αλλά και σε φύκια, μετατρέπεται σε πρόδρομα μόρια για το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA, C20:5, ω-3) και εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (DHA, C22:6, ω-3) μέσω ενός ίδιου ενζυμικού συστήματος με το LA. Τα πολυακόρεστα είναι κυρίως εστεροποιημένα σε τριακυλογλυκερόλες και δευτερεύοντως σε γλυκεροφωσfolιπίδια και εκκρίνονται στο αίμα. Έπειτα από την υδρόλυσή τους από την κυτταροπλασματική φωσfolιπάση A2 (cPLA2) τα απελευθερωμένα λιπαρά οξέα εισέρχονται στα κύτταρα είτε δεσμεύονται στην αλβουμίνη του πλάσματος [Lagarde et al., 2013].



Εικόνα 1.13 Απεικόνιση της συσσώρευσης του ενδοκυτταρικού λίπους στην παρούσα μελέτη, μέσω οπτικού μικροσκοπίου

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην εικόνα που παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 2.1), απεικονίζεται συνοπτικά η πειραματική διαδικασία της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης. Το πρώτο μέρος αφορά στην επεξεργασία του απόβλητου λαχανικού και την αξιοποίησή του με την εκχύλιση των προϊόντων προστιθέμενης αξίας (φαινολικές ενώσεις, πρωτεΐνες). Στην συνέχεια, στο στερεό κλάσμα που έχει απομείνει και είναι πλούσιο σε πολυσακχαρίτες, πραγματοποιείται ενζυμική υδρόλυση. Καθώς το υδρόλυμα πλέον είναι πλούσιο σε μονοσακχαρίτες αξιοποιείται ως υπόστρωμα (πηγή άνθρακα) σε μικροβιακές ζυμώσεις για την παραγωγή γ -λινολενικού οξέος, από το μικροβιακό στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411.



Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη

2.1 Συλλογή αποβλήτου λαχανικού

Τα απόβλητα μπρόκολου, πιο συγκεκριμένα το φυλλώδες μέρος του μπρόκολου, συλλέχθηκαν από λαχαναγορές των νοτίων προαστίων. Αρχικά διαχωρίστηκαν τα φύλλα από το κοτσάνι και αφού πολτοποιήθηκαν σε μπλέντερ, στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ο πολτός αξιοποιήθηκε ως βιοδυλιστήριο αλλά και πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σχετικά με τον προσδιορισμό της συστασής του. Με την εκμετάλλευσή του ως βιοδυλιστήριο, πρώτο βήμα αποτέλεσε η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών του και των πρωτεϊνών του και μετέπειτα στο στερεό που απέμεινε πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση. Το υδρόλυμα του απόβλητου λαχανικού με την κατάλληλη ποσότητα σακχάρων χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για ζύμωση κλειστής καλλιέργειας.

2.2 Ζυμώσεις

Για την πραγματοποίηση των υγρών ζυμώσεων κλειστής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411. Ο υπό μελέτη μύκητας ανήκει στην κατηγορία των ζυγομυκήτων και ανήκει στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, φυλλασόμενο στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Εφόσον ανανεωθεί, το στέλεχος επωάζεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 3-4 ημέρες σε κεκλυμένους γυάλινους σωλήνες με υπόστρωμα αποτελούμενο από PDA (Potato Dextrose Agar) και στη συνέχεια διατηρείται σε θερμοκρασία $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Όσον αφορά στην προκαλλιέργεια, έγινε εμβολιασμός με 800 μl από τον μύκητα σε κωνική των 250 mL και αντίστοιχα 200-300 μl σε slant καθώς και προστέθηκαν 50 mL θρεπτικό υλικό. Τέλος, για να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους ανανεώνονταν κάθε ένα μήνα. Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ενώ όλα τα θρεπτικά υποστρώματα και οι πρώτες ύλες παρασκευάζονταν την στιγμή που θα γινόταν η αξιοποίησή τους, αφού πρώτα αποστειρώνονταν στους $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 20 λεπτά.

2.3 Θρεπτικό Υπόστρωμα

Για κάθε μια από τις ζυμώσεις (κλειστού τύπου), παρασκευάστηκαν 2 προκαλλιέργειες σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Όσον αφορά στο θρεπτικό υλικό ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά σάκχαρα συγκέντρωσης 30 g/L , ενώ ως

πηγή αζώτου 3 g/L yeast extract (οργανική) και 0,5 g/L θειϊκό αμμώνιο (ανόργανη) ((NH₄)₂SO₄). Τέλος, προστίθεται μίγμα αλάτων που παρουσιάζεται αναλυτικά με τις συγκεντρώσεις του στον πίνακα 2.1.

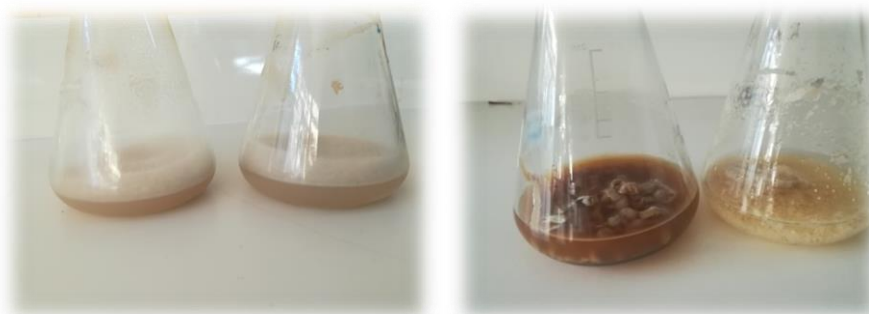
Πίνακας 2.1 Συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό μέσο

Διάλυμα αλάτων	Συγκέντρωση (g/L)
KH ₂ PO ₄	7,14
Na ₂ HPO ₄	2,55
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,53
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,09
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,06
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15

Στόχος του πειράματος ήταν η μελέτη της ικανότητας του στελέχους *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 να καταναλώσει διαφορετικές πηγές άνθρακα. Τα συνθετικά υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, είχαν ως πηγή άνθρακα γλυκόζη, ξυλόζη, μαννόζη, γαλακτόζη σε συγκέντρωση 30 g/L καθώς και η αραβινόζη σε συγκέντρωση 15 g/L, με την υπόλοιπη σύσταση να παραμένει ίδια σε αναλογία με αυτή των κύριων καλλιιεργειών. Στη ζύμωση όπου χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα το υδρόλυμα από το απόβλητο λαχανικό, προστέθηκαν μόνο άλατα. Οι πηγές αζώτου δεν προστέθηκαν καθώς στη συστασή του περιεχόταν επαρκής ποσότητα αζώτου ελεύθερων αμινομαδων ώστε να πραγματοποιηθεί η ζύμωση. Η ανάμιξη πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες μετά την αποστείρωση. Το υδρόλυμα το λαχανικού είχε τελική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L και την αναλογία να είναι η εξής: 55,57 % γλυκόζη, 5,54 % σακχαρόζη, 14,41 % ξυλόζη, 15,56 % γαλακτόζη και 8,89 % αραβινόζη. Τέλος, πραγματοποιήθηκε και μικροβιακή ζύμωση με συνθετικό υπόστρωμα χρησιμοποιώντας τα εμπορικά σάκχαρα στην ίδια αναλογία με αυτή του υδρολύματος, τελικής συγκέντρωσης 30,61 g/L με την προσθήκη αλάτων και πηγών αζώτου.

2.4 Ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας σε κωνικές φιάλες

Το διάλυμα της πηγής άνθρακα, το διάλυμα μίγματος αλάτων και το διάλυμα πηγών αζώτου σε διαφορετικές duran με τελικό όγκο 1 L, αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο (121°C /1,5 atm, 20 min). Μετά την αποστείρωσή τους αναμιγνύονται υπό ασηπτικές συνθήκες όπου και γίνεται διαμοιρασμός τους στις κωνικές φιάλες των 250 mL. Για τον εμβολιασμό γίνεται αξιοποίηση της μιας εκ των 2 προκαλλιεργειών (Εικόνα 2.2) που παρασκευάστηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Οι ζυμώσεις κλειστού τύπου που πραγματοποιήθηκαν για την παραγωγή μικροβιακού ελαίου αναπτύχθηκαν σε κωνικές των 250 mL με ενεργό όγκο 50 mL. Το θρεπτικό υλικό αποτελούσε τα 49 mL. Για την συμπλήρωση του ενεργού όγκου προσθέσαμε 1 mL ($3,5 \cdot 10^5$ cfu) από την προκαλλίεργεια, στην οποία είχαμε προσθέσει 40 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού που περιείχε 1-2 σταγόνες σταθεροποιητικού twin). Η τιμή του pH ισούται με 6. Με την ολοκλήρωση του εμβολιασμού οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε επωαστήρα (New Brunswick Sc, Usa) υπό ανάδευση σε 180 rpm και θερμοκρασία 30 °C. Οι ζυμώσεις με τα εμπορικά σάκχαρα πραγματοποιήθηκαν δυο φορές ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 2.2 Απεικόνιση (αριστερά) των προκαλλιεργειών σε υπόστρωμα PDA και ανάπτυξη του μικροορατισμού σε υπόστρωμα υδρολύματος απόβλητου και συνθετικών σακχάρων (120 h) (δεξιά)

2.5 Αναλύσεις

2.5.1 Προσδιορισμός υγρασίας

Η μέθοδος στηρίζεται στην ποσοστιαία εύρεση απώλειας βάρους του εκάστοτε δείγματος με την ξηρανσή του. Η παραδοχή στην οποία στηρίζεται η μέθοδος είναι ότι η συνολική απώλεια βάρους του δείγματος οφείλεται στην απομάκρυνση υγρασίας.

Κάθε δείγμα ζυγίστηκε ξεχωριστά σε αναλυτικό ζυγό (MettlerToledo) και στην συνέχεια ξηράνθηκε σε φούρνο (Memmert) σε θερμοκρασία 77 °C για 24 ώρες. Μετά την ξήρανση ακολούθησε η τοποθετησή του σε ξηραντήρα με σκοπό η θερμοκρασία του δείγματος να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος να ζυγιστεί σε αναλυτικό ζυγό 4 δεκαδικών ψηφίων. Το ποσοστό της υγρασίας υπολογίζεται από παρακάτω εξίσωση :

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

2.5.2 Προσδιορισμός και μέτρηση του pH

Το pH, το οποίο μετρήθηκε τόσο στα διαλύματα του μπρόκολου όσο και στα διαλύματα της καλλιέργειας καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, προσδιορίστηκε με πεχάμετρο τύπου Jenway 3020 pHmeter τύπου HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna Instruments.

2.5.3 Εκχύλιση αντιοξειδωτικών

Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών του μπρόκολου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύτη αιθανόλης (EtOH 70 %) καθώς και με τη χρήση οξινισμένης αιθανόλης (EtOH 70 % -HCl 0,01 M) σε δείγμα το οποίο προηγουμένως είχε ξηρανθεί. Πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις 1:80 w/v, 1:40 w/v και 1:30 w/v ώστε να παρατηρηθεί σε ποια από αυτές θα έχουμε την βέλτιστη εκχύλιση των φαινολικών συστατικών [A.M. Agres et al.2013]. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL με τελικό ενεργό όγκο 50 mL και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων για 45 λεπτά. Το υπερκείμενο του εκχυλίσματος εξατμίστηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα, σε χαμηλή θερμοκρασία (<60 °C) ώστε να μην καταστραφούν τα αντιοξειδωτικά στοιχεία και έπειτα προστέθηκε MeOH . Το στερεό ίζημα διαλυτοποιήθηκε με την προσθήκη της μεθανόλης σε υδατόλουτρο υπερήχων για 5 λεπτά. Ακολούθως, στο διάλυμα πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις Folin – Ciocalteau και DPPH.

2.5.4 Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Στο ίζημα από το οποίο εκχυλίστηκαν τα αντιοξειδωτικά πραγματοποιείται απομάκρυνση πρωτεϊνών. Με αραιώση 1:5 του δειγματος μας με νερό προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα NaOH 10M μέχρι το pH να ισούται με 10. Το δείγμα παρέμεινε υπό ανάδευση για μια ώρα με συνεχή έλεγχο του pH ώστε να μην μεταβάλλεται. Μετά

το πέρας της μιας ώρας διαχωρίστηκε με τη διαδικασία της φυγοκέντρωσης το ίζημα από το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, στο υπερκείμενο προστέθηκε ελάχιστη ποσότητα HCl ώστε το pH να φτάσει στο 3,8-4. Το διάλυμα παρέμεινε στο ψυγείο έως ότου να ψυχθεί. Εφόσον ψύχθηκε παρατηρήθηκαν στον πάτο του ποτηριού οι πρωτεΐνες που είχαν κατακρημνιστεί [Xu et al., 2017].

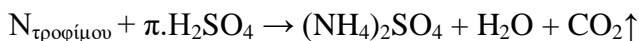
2.5.5 Προσδιορισμός Πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Kjeldahl (Εικόνα 2.3) [Campas-Baypoli et al., 2009, Ares et.al, 2013]. Όσον αφορά στη διαδικασία της μεθόδου χωρίζεται σε 3 στάδια, την πέψη, την απόσταξη και την τιτλοδότηση. Μέσα σε μακρύλαιμο σωλήνα τοποθετείται ποσότητα δείγματος (~5 mg) τυλιγμένη σε ριζόχαρτο, μια ταμπλέτα Kjeldahl (96,5 % θειικό νάτριο – Na₂SO₄, 1,5 % θειικός χαλκός - CuSO₄ και 2,00 % σελήνιο – Se), η οποία δρά ως καταλύτης της αντίδρασης, 25 ml θειικό οξύ (H₂SO₄) 98 % v/v για την οξείδωση της οργανικής ύλης καθώς και 2 σταγόνες αντιαφριστικού διαλύματος. Για την πραγματοποίηση της πέψης, ο σωλήνας τοποθετείται στη μονάδα πέψης για 1 ώρα στους 410 °C ώστε να δημιουργηθεί ισχυρός βρασμός με στόχο την πλήρη διαλυτοποίηση. Η πέψη έχει ολοκληρωθεί όταν το δείγμα είναι απόλυτα διαυγές με ένα ελαφρώς μπλέ χρώμα εξαιτίας του χαλκού από τον καταλύτη. Στόχος της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι η διάσπαση όλων των δεσμών αζώτου και η μετατροπή τους σε ιόντα αμμωνίου (NH₄⁺). Έπειτα, η φιάλη αφήνεται έως ότου φτάσει τους 40 °C. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της απόσταξης για το οποίο είναι απαραίτητη η παρασκευή διαλύματος βορικού οξέος (H₃BO₃). Για την παρασκευή 1 L διαλύματος του, απαιτούνται 40 g στερεού H₃BO₃, 10 mL διαλύματος δείκτη πράσινο της βρωμοκρεσόλης (1 g/L), 7 mL διαλύματος δείκτη ερυθρό του μεθυλίου (1 g/L) και απιονισμένο νερό. Αφήνονται υπό ανάδευση για 12 ώρες. Η μονάδα απόσταξης (Foss, Kjeltac 8100, Distillation unit) αποτελείται από 2 υποδοχές, μια για τον μακρύλαιμο σωλήνα και μια για 50 mL H₃BO₃ που έχουν προστεθεί σε μια κωνική φιάλη. Ο χρόνος ολοκλήρωσης της απόσταξης είναι 5 λεπτά, όπου στο τέλος παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος (έντονο ροζ → πράσινο). Αυτό οφείλεται στην επίδραση των δεικτών καθώς και την προσθήκη NaOH (40 % w/v), για την εξουδετέρωση του pH και την μετατροπή του NH₄⁺ σε NH₃. Η ανάλυση ολοκληρώνεται με το στάδιο της τιτλοδότησης του δείγματος με HCl κανονικότητας 0,1 N μέχρι το διάλυμα να αποκτήσει ένα ελαφρώς βιολετί χρώμα. Με

την κατανάλωση και τη συγκέντρωση του HCl μπορούμε να υπολογίσουμε το % του αζώτου στο δείγμα και στη συνέχεια το % πρωτεΐνης.

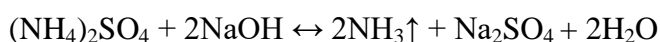
Παρακάτω, παρατίθενται οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στα 3 στάδια της διεργασίας:

1^ο Στάδιο: Πέψη



(Καταλύτης της αντίδρασης Cu^{2+} , επίδραση θέρμανσης)

2^ο Στάδιο: Απόσταξη



3^ο Στάδιο: Τιτλοδότηση



Το ποσοστό της πρωτεΐνης βρέθηκε από τη σχέση % Πρωτεΐνης = (% N) * 6,25 (πρωτεϊνικός παράγοντας μπρόκολου) [Campas-Bayroli et al., 2009, Gu et al., 2011].

Το ποσοστό του αζώτου υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\% N = \frac{(\text{mL δείγματος} - \text{mL τυφλού}) * 0,1 N * 14,007}{\text{mg δείγματος}} * 100$$



Εικόνα 2.3 Απεικόνιση συσκευής πέψης και απόσταξης για την ανάλυση της Kjeldahl, καθώς και τα διαλύματα πριν και μετά την τιτλοδότηση

2.5.6 Εκχύλιση διαλυτών ενώσεων σε νερό και αιθανόλη (extractives)

Σε αποξηραμένη ποσότητα δείγματος, μέσω λυοφιλίωσης χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο H_2O ως διαλύτης, με στόχο την εκχύλιση των υδατοδιαλυτών συστατικών

του και πιο συγκεκριμένα ανόργανα συστατικά, μη δομικούς υδατάνθρακες και αζωτούχες ύλες. Η εκχύλιση διήρκεσε περίπου 24 ώρες. Στην συνέχεια, με τη χρήση αιθανόλης 97% v/v πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των οργανικά διαλυτών ενώσεων όπως κηροί, ιχνοστοιχεία και η χλωροφύλλη. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε για 16 ώρες. Οι χρόνοι εκχύλισης στην συσκευή soxhlet (Εικόνα 2.4) μπορεί να μεταβληθούν ανάλογα με την περιεκτικότητα της πρώτης ύλης σε διαλυτές ενώσεις [Fernandes et al., 2017, Ares, et al., 2013]



Εικόνα 2.4 Εκχύλιση υδατοδιαλυτών συστατικών

2.5.7 Ποσοτικός προσδιορισμός λιγνίνης και μονοσακχαριτών προερχόμενων από υδρόλυση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, σε στερεά δείγματα βιομάζας (NREL)

Το δείγμα το οποίο παρέμεινε μετά την εκχύλιση των υδατοδιαλυτών και των οργανικών ουσιών από τη soxhlet, ξηραίνεται μέσω λυοφιλικής και χρησιμοποιείται για τον προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη. Ο προσδιορισμός των συγκεκριμένων πολυσακχαριτών θα πραγματοποιηθεί με όξινη υδρολύση τους. Πιο συγκεκριμένα, σε φιάλη αναερόβιωσης προστίθενται 300 ± 10 mg λυοφιλωμένου ξηρού δείγματος με $3 \pm 0,01$ mL H_2SO_4 72% w/w, η οποία παραμένει σε υδατόλουτρο 30 ± 3 °C, για μία ώρα υπό ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθενται $84 \pm 0,04$ mL δισαπεσταγμένο νερό, με σκοπό την αραιώση του θειικού οξέος στο 4 % τελικής συγκέντρωσης, και η φιάλη αποστειρώνεται σε αυτόκλειστο για μια ώρα. Επειδή η ποσότητα του δείγματος είναι πολύ μικρή, διηθήθηκε σε ειδικό φίλτρο μέσω ηθμού Buchner και στην συνέχεια ξηράνθηκε σε φούρνο για 24 ώρες στους 70 °C. Η ποσότητα

που παρέμεινε μετά την όξινη υδρόλυση αποτελεί το όξινο αδιάλυτο υπόλειμμα, ενώ η κυτταρίνη υδρολύθηκε σε γλυκόζη και η ημικυτταρίνη σε μαννόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη και γλυκόζη. Το υπερκείμενο που λαμβάνεται μετά τη διήθηση χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της όξινης διαλυτής λιγνίνης μέσω φασματοφωτομέτρου UV-Vis στα 240 nm με την επιθυμητή τιμή να βρίσκεται μεταξύ 0,7-1. Ακόμη, το υπερκείμενο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των υδατανθρακών μέσω της HPLC. Πιο συγκεκριμένα, για να έχουμε ακριβή αποτελέσματα στις συγκεντρώσεις των διασακχαριτών χρησιμοποιήθηκαν 2 στήλες HPLC η Aminex και η Sdex . Από το υπερκείμενο μετά τη διήθηση λαμβάνονται 2 mL σε παλστικό φιαλίδιο εις διπλούν, αραιώνονται με 10 mM H₂SO₄, φιλτράρονται με φιλτράκι Whatman με πόρους διαμέτρου 0,2 μm και ο προσδιορισμός γίνεται με στήλη Aminex HPX-87P. Ξεχωριστά λαμβάνονται 20 mL από το υπερκείμενο στο οποίο γίνεται διόρθωση pH μεταξύ των τιμών 5-6 με ανθρακικό ασβέστιο. Αφήνεται σε ηρεμία ώστε να διαχωριστεί το υπερκείμενο από το στερεό ανθρακικό ασβέστιο που έχει προστεθεί και αφού γίνει και πάλι αραιώση με 10 mM H₂SO₄ και φιλτράρισμα ακολουθεί ανάλυση με στήλη Shodex SP0810. Έπειτα το δείγμα το οποίο απέμεινε τοποθετήθηκε μαζί με το φίλτρο σε ειδική κάψα και όλο μαζί παρέμεινε σε ειδικό φούρνο για 24 ώρες στους 575 °C. Το δείγμα μετατράπηκε σε στάχτη προσδιορίζοντας έτσι την όξινη αδιάλυτη λιγνίνη.

Υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με βάση τις παρακάτω εξισώσεις,

- Υπολογισμός ξηρού βάρους δειγμάτων

$$\text{ODW} = \text{Weight}_{\text{airdrysample}} * \% \text{Total solids} / 100$$

$$\text{Όπου, \% Total solids} = (\text{Weight}_{\text{dried sample plus dish}} - \text{Weight}_{\text{dish}}) * 100 / \text{weight}_{\text{sample as received}}$$

- Υπολογισμός Αδιάλυτου Υπολείμματος (AIR) και Αδιάλυτης Λιγνίνης (AIL):

$$\% \text{AIR} = (\text{Weight}_{\text{crucible plus AIR}} - \text{Weight}_{\text{crucible}}) * 100 / \text{ODW}_{\text{sample}}$$

$$\% \text{AIL} = [(\text{Weight}_{\text{crucible plus AIR}} - \text{Weight}_{\text{crucible}}) - (\text{Weight}_{\text{crucible plus ash}} - \text{Weight}_{\text{crucible}}) - \text{Weight}_{\text{protein}}] * 100 / \text{ODW}_{\text{sample}}$$

- Υπολογισμός Διαλυτής Λιγνίνης (ASL):

$$\% \text{ASL} = \text{UV}_{\text{abs}} * \text{Volume}_{\text{filtrate}} * \text{dilution} * 100 / \epsilon * \text{ODW}_{\text{sample}} * \text{Pathlength}$$

όπου, $\text{Volume}_{\text{filtrate}}=86,73 \text{ mL}$

$\text{Dilution} = (\text{Volume}_{\text{sample}} + \text{Volume}_{\text{diluting solvent}}) / \text{Volume}_{\text{sample}}$

ODW= βάρος ξηρού δείγματος σε mg

Pathlength= μήκος κύματος σε 1 cm

$\epsilon = 25 \text{ (L/g*cm)}$

- Υπολογισμός συνολικής λιγνίνης:

$\% \text{Lignin} = \% \text{ASL} + \% \text{AIL}$

- Υπολογισμός της εκατοστιαίας ποσότητας σακχάρου κάθε προτύπου που λήφθηκε μετά τη υδρόλυση

$\% R_{\text{sugar}} = C_{\text{sugar by HPLC}} \text{ (mg/mL)} * 100 / C_{\text{sugar before hydrolysis}} \text{ (ml/ml)}$

- Υπολογισμός της συγκέντρωσης του σακχάρου κάθε δείγματος μετά την υδρόλυση σύμφωνα με τις τιμές της HPLC

$C_x \text{ (mg/mL)} = C_{\text{HPLC}} \text{ (mg/mL)} * \text{dilution factor} * 100 / \% R_{\text{sugar}}$

- Υπολογισμός της συγκέντρωσης πολυσακχαριτών βάσει της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών

$C_{\text{anhydro}} = C_{\text{corr}} * \text{Anhydro correction}$

Όπου, $C_{\text{corr}} = C_x$

Όπου, anhydrocorrection είναι διορθωτικός συντελεστής που ισούται με 0,89 για τη ξυλόζη, γαλακτόζη και μαννόζη, 0,88 για αραβινόζη και 0,90 για γλυκόζη.

$C_{\text{anhydro xylan}} = (\text{Xylose}_{\text{corr}} - \text{Xylose}_{\text{AA correction}}) * 132/150$

Όπου, $\text{Xylose}_{\text{AA correction}} = (C_{\text{acetic acid}} / C_{\text{xylose}}) * 17(\text{OH-MW}) / 132(\text{xylose MW})$

- Υπολογισμός εκατοστιαίας τιμής κάθε σακχάρου «onanextractivesfreebasis»

$\% \text{Sugar}_{\text{ext free}} = C_{\text{anhydro}} * V_{\text{filtrate}} * 100 / \text{ODW}_{\text{sample}} * 1000$

Όπου, $V_{\text{filtrate}} = 86,73 \text{ mL}$

2.5.8 Υδρολύσεις

Η υδρόλυση των λιγνοκυτταρινούχων λαχανικών μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω οξέων, βάσεων και ενζύμων. Όσον αφορά την ενζυμική υδρόλυση, τα ένζυμα έχουν την δυνατότητα να δρουν ως βιολογικοί καταλύτες, να υδρολύουν το γλυκοσιδικό δεσμό με αποτέλεσμα να προκύπτουν οι αντίστοιχοι μονοσακχαρίτες. Στην ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι οι ενδο-γλυκανάσες, οι έξω-γλυκανάσες και οι β-γλυκοσιδάσες. Δύο είναι τα πλεονεκτήματα της ενζυμικής υδρόλυσης έναντι της όξινης. Πρώτον μπορούν να πραγματοποιηθούν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και δεύτερον κατά τη διαδικασία αυτή δεν παράγονται παραπροϊόντα, όπως η φουρφουράλη και υδρόξυ-μέθυλο φουρφουράλη των οποίων η δράση είναι παρεμποδιστική [Taylor et al., 2015].

Στο πολτοποιημένο απόβλητο λαχανικό πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση, με τη χρήση των ενζύμων της ημικυτταρινάσης και του viscozyme. Πιο αναλυτικά, ο πολτός του μπρόκολου αραιώθηκε σε αναλογία 1:5 w/v με νερό και στη συνέχεια αποστειρώθηκε στους 121 °C για 20 λεπτά, σε αυτόκαυστο. Η τιμή του pH του μετρήθηκε 4,80±0,09. Αφότου αποστειρώθηκε, προστέθηκαν η ημικυτταρινάση (10 U/g) και το viscozyme (100 U/g) υπό ασυπτηκές συνθήκες, ενώ τέλος η διαδικασία της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση, στους 40 °C για 2 ημέρες. Η επιλογή των συγκεκριμένων ενζύμων έγινε με στόχο την υδρόλυση της ημικυτταρίνης από την ημικυτταρινάση και από το viscozyme την υδρόλυση τόσο της ημικυτταρίνης όσο και της κυτταρίνης. Το ξηρό βάρος, με βάση το οποίο υπολογίστηκε η ποσότητα των ενζύμων και του νερού που θα προστέθηκε, υπολογίστηκε από τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Ξηρό βάρος (g)} = \text{Nωπό δείγμα (g)} - (\text{Nωπό δείγμα (g)} * (\text{υγρασία δείγματος}))$$

2.5.9 Προσδιορισμός τέφρας

Ο προσδιορισμός της τέφρας πραγματοποιήθηκε βαρομετρικά καθώς προζυγισμένη αποξηραμένη ποσότητα μπρόκολου τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο φυαλίδιο. Τοποθετήθηκαν σε φούρνο με θερμοκρασία 550 °C για 8 ώρες. Μετά το πέρας των 8 ωρών τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα, ώστε η θερμοκρασία του δείγματος να επέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και να ζυγιστεί σε αναλυτικό ζυγό [Campas-Baypoli

et al., 2009]. Η ποσότητα που απέμεινε αποτελεί την τέφρα του δείγματος και υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ Τέφρας} = \frac{\text{τελικό βάρος δείγματος } g}{\text{αρχικό βάρος δείγματος } g} * 100$$

2.5.10 Προσδιορισμός λίπους

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού λίπους, αποξηραμένη ποσότητα μπρόκολου τοποθετήθηκε σε βαμβακερή θήκη. Η θήκη στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε συσκευή Soxhlet (Εικόνα 2.5) προς εκχύλιση του λίπους για 4 ώρες, με το εξάνιο ως τον επιλεγμένο διαλύτη. Μετά το πέρας των 4 ωρών, η σφαιρική φιάλη, η οποία περιείχε το εκχύλισμα με τον διαλύτη, τοποθετήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα, ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης και στο τέλος να παραμείνει μόνο το στερεό υπόλειμμα, το οποίο ισούται με το λίπος του λαχανικού [Ares et.al, 2013].

$$\% \text{ Λίπους} = \frac{\text{στερεό υπόλειμμα } g}{\text{αρχικό βάρος δείγματος } g} * 100$$

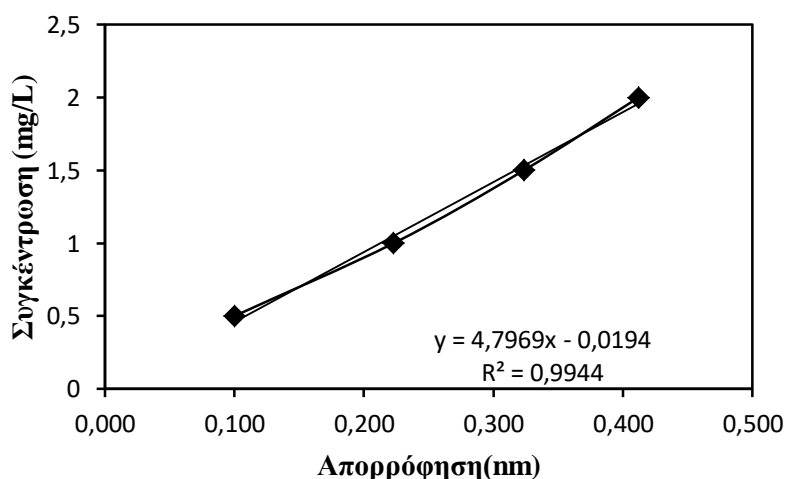


Εικόνα 2.5 Εκχύλιση Λίπους μέσω soxhlet

2.5.11 Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen - FAN)

Η μέθοδος FAN (Free Amino Nitrogen) στηρίζεται στον προσδιορισμό του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων μέσω της φωτομετρικής μεθόδου της νυνιδρίνης. Για την πραγματοποίηση της μεθόδου απαιτούνται δύο αντιδραστήρια, πρώτον το αντιδραστήριο χρώσης (Color reagent) και στη συνέχεια το αντιδραστήριο αραίωσης (Dilution reagent). Όσον αφορά το αντιδραστήριο χρώσης, αποτελείται από ένυδρο

όξινο φωσφορικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 49.71 g/L), νινυδρίνη (5 g/L), φρουκτόζη (3 g/L) και δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4 , ~40 g/L). Αναμιγνύω όλα τα αντιδραστήρια πέρα από το ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο μέχρι να ομογενοποιηθούν και στη συνέχεια προσθέτω το τελευταίο, μέχρι το pH να φτάσει το 6.6-6.8. Το αντιδραστήριο είναι φωτοευαίσθητο για αυτό και διατηρείται στο ψυγείο μακριά από το φως. Το αντιδραστήριο της αραίωσης αποτελείται από ιωδιούχο κάλιο (KIO_3 , 2 g/L), αιθανόλη (EtOH 96 %, 384 mL) και νερό (~616 mL). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε με βάση το πρωτόκολλο περιείχε 1 mL αραιωμένου δείγματος με προσθήκη 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης και βρασμό (100 °C) για 16 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο για 20 λεπτά ώστε να λάβει τέλος η αντίδραση και τέλος προστέθηκαν 2,5 mL από το διάλυμα αραίωσης. Πριν τη φωτομετρική τους ανάλυση στα 540 nm, κάθε δείγμα αναδεύτηκε για 20 δευτερόλεπτα. Τέλος, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη γλυκίνης (Γράφημα 2.1), με συγκεντρώσεις προτύπων 0.5, 1, 1.5, 2 mg/L, ώστε να εκφραστούν τα αποτελέσματα [Lie, 1973].

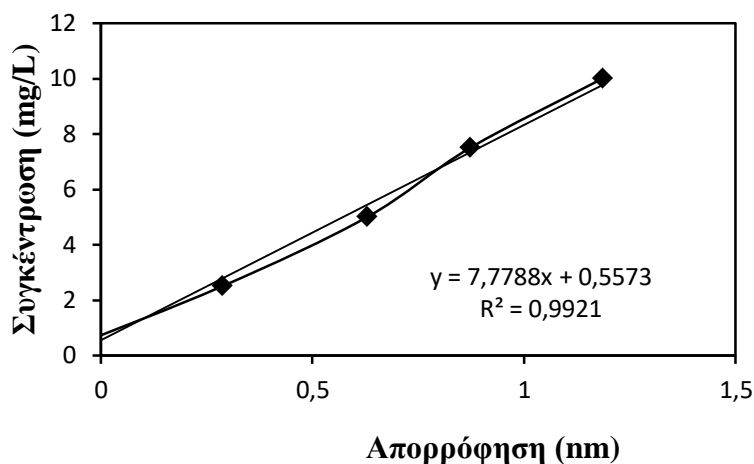


Γράφημα 2.1 Πρότυπη καμπύλη γλυκίνης για τον προσδιορισμό αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων

2.5.12 Προσδιορισμός Ανόργανου Φωσφόρου (IP)

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην περιεκτικότητα φωσφόρου σε διάλυμα όξινου φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4). Για το προσδιορισμό του ανόργανου φώσφορου, σε αραιωμένο δείγμα τελικού όγκου 5 mL προστείνονται 0,4 mL υπερχλωρικού οξέος 60 % (v/v) και αναδεύονται για 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.3 mL

L-ασκορβικού οξέος (10 g/L) και αναδεύονται για 10 δευτερόλεπτα, ενώ τέλος προστίθενται 0,4 mL επταμολυβδαινιακού αμμωνίου όπου και πάλι το δείγμα αναδεύεται για 10 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία και σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Οι απορροφήσεις μετρήθηκαν στα 730 nm στο φασματοφωτόμετρο UV – Vis (Hitachi, U – 2000, Spectrophotometer). Για τον ακριβή προσδιορισμό του ανόργανου φώσφορου σχεδιάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης (γράφημα 2.2) με συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5 και 10 mg/L K_2HPO_4 [Chen et al., 1956].



Γράφημα 2.2 Πρότυπη καμπύλη K_2HPO_4 για τον προσδιορισμό ανόργανου φωσφόρου

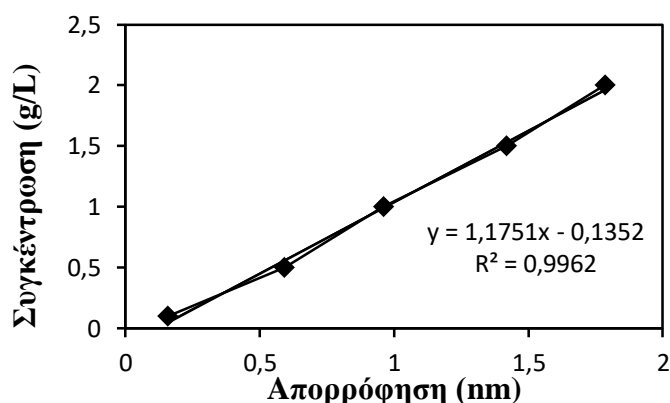
2.5.13 Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των καταναλοθέντων σακχάρων και των παραγόμενων οξέων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Όλα τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των σακχάρων και των παραγόμενων οξέων αφού πρώτα αραιώθηκε με 10 mM H_2SO_4 και φιλτραρίστηκε με τη χρήση φίλτρων whatman που διέθεταν μεμβράνη με πόρους διαμέτρου 0,2 μm . Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του, χρησιμοποιήθηκε η στήλη (στατική φάση) Aminex HPX-87H με διαστάσεις 300 mm x 7,8 mm, με κινητή φάση διάλυμα H_2SO_4 συγκέντρωσης 10 mM. Ο ανιχνευτής είναι τύπου RI (Shimadzu), ο δειγματολείπτης είναι αυτόματος και ο όγκος της ένεσης ανέρχεται στα 10 μL . Η τεχνική πραγματοποιείται με ρυθμό ροής 0,6 mL/min, στην θερμοκρασία των 65 °C. Τέλος,

χρησιμοποιείται η τεχνική της ισοκρατικής έκλυσης καθώς το H₂SO₄ αποτελεί το μοναδικό διαλύτη.

2.5.14 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου μέσω της μεθόδου Folin – Ciocalteu

Πιο αναλυτικά, η συγκεκριμένη μέθοδος κουλομετρίας, στηρίζεται στη διαδικασία του Bonoli et.al χρησιμοποιώντας γαλλικό οξύ ως πρότυπη φαινολική ένωση. Το μεθανολικό διάλυμα 50 μL αραιώνεται με 450 μL απιονισμένο νερό, προστίθεται 0,5 mL Folin (0,2N) και το διάλυμα αναδεύεται για 5 min. Στη συνέχεια, προστίθενται 2 mL Na₂CO₃ (75 g/L) και αφήνονται σε επωαστήρα υπό ανάδευση για 1 ώρα και 30 λεπτά στους 30 °C. Η απορρόφηση του δείγματος πραγματοποιείται στα 765 nm. Τέλος, για τον προσδιορισμό της ολικής περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (Γράφημα 2.3) με εύρος τιμών 0,1-2 g/L [Matejić et al., 2012, Büchert , 2010, Faustino et al., 2010, Bhandari and Kwak, 2015, Bonoli et al., 2004].

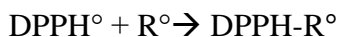
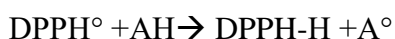


Γράφημα 2.3 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για τον προσδιορισμό ολικού φαινολικού περιεχομένου

2.5.15 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της μεθόδου DPPH

Η ανάλυση μέσω του διαλύματος DPPH γίνεται με στόχο να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. Πιο αναλυτικά, η αντιοξειδωτική ικανότητα στηρίζεται στην αντίδραση της σταθερής ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH°) με την αντιοξειδωτική ένωση σε διάλυμα μεθανόλης [Bhandari and Kwak, 2015]. Η αναγωγή του DPPH° παρατηρείται από την μείωση της απορροφησής του στο

χαρακτηριστικό μήκος κύματος των 517 nm. Μετά από την αναγωγή της ρίζας DPPH με ένα αντιοξειδωτικό (AH) ή με ένα είδος ρίζας (R°) η απορρόφηση εξαφανίζεται [Brand-Williams et al., 1995, Gunathilake and Ranaweera, 2016]



Όσον αφορά το πειραματικό κομμάτι, σε 0,1 mL του μεθανολικού διαλύματος προστίθενται 3,9 mL DPPH (0,0032 g / 100 mL MeOH) αφήνονται σε σκοτεινό μέρος για 1 ώρα και 30 λεπτά. Τέλος, γίνεται η φωτομέτρησή του στα 517 nm, όπως προαναφέραμε, χρησιμοποιώντας ως τυφλό διάλυμα MeOH.

$$\text{I\%} = [(\text{Abs}_0 - \text{Abs}_1) / \text{Abs}_0] \times 100,$$

$$\text{AAI} = \frac{\text{τελική συγκέντρωση DPPH στο τυφλό } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}{\text{IC}_{50} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)} * 100 \text{ [Faustino et al., 2010]}$$

Όπου, Abs₀, η απορρόφηση του τυφλού

Abs₁, η απορρόφηση του διαλύματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

AAI, ο δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας

IC₅₀, η συγκέντρωση που παρέχει το 50% της εγκατάστασης

2.5.16 Προσδιορισμός Σπορίων

Η μέτρηση των σπορίων πραγματοποιήθηκε μέσω οπτικού μικροσκοπίου σε πλάκα αιματοκυτταρομέτρου Thoma. Πιο αναλυτικά η πλάκα αποτελείται από 2 πλέγματα μέτρησης, τα οποία διαιρούνται σε 9 τετράγωνα, τα οποία με τη σειρά τους υποδιαιρούνται σε 16 τετράγωνα. Το καθένα τετράγωνο μιας δεκαεξάδας έχει εμβαδό 0,0025 mm² και ύψος 0,1 mm. Τέλος, υπολογίζεται ο μέσος όρος σπορίων ανά mL από την μέτρηση των σπορίων στις δεκαεξάδες τετραγώνων. Ο υπολογισμός των σπορίων σε κάθε τετράγωνο ανά ml βρίσκεται από την παρακάτω εξίσωση.

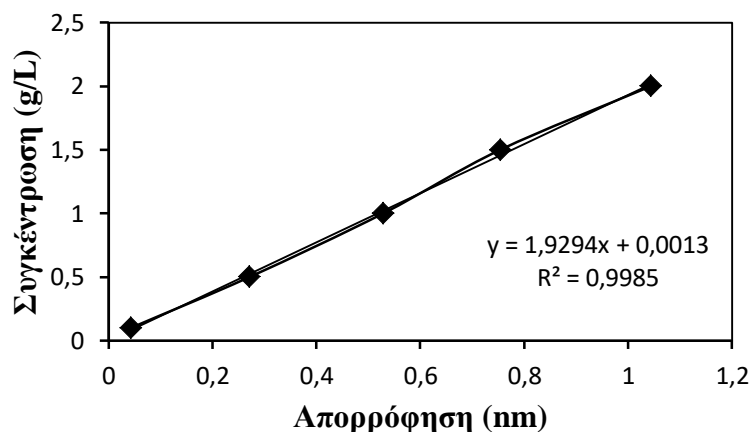
$$\text{Αριθμός σπορίων / mL} = \frac{\text{αριθμός σπορίων ανά τετράγωνο}}{0,0025 \text{ mm}^2 * 0,1 \text{ mm}} * 1000$$

2.5.17 Συλλογή και προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας

Η συλλογή βιομάζας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου εσχαρισμού , χρησιμοποιώντας σχάρα ASTM E-M, U.S. Standard Sieve Series, με διάσταση πόρων 106 μm . Πιο αναλυτικά, το υπερκείμενο από την καλλιέργεια διαπερνά τους πόρους της σχάρας, ενώ τα μυκήλια παραμένουν στην επιφάνεια της καθώς ξεπλένεται με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια τα μυκήλια συλλέγονται σε προζυγισμένα φιαλίδια mac cartney και τοποθετούνται σε φούρνο στους 85 °C προς ξήρανση για 1-2 μέρες και μετέπειτα έρχονται σε θερμοκρασία δωματίου σε ξηραντήρα. Ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας τύπου Kern ABJ (4 δεκαδικών ψηφίων). Η διαφορά του άδειου φιαλιδίου με αυτό που έφερε το ξηρό υπόλειμμα ισούται με την παραγόμενη βιομάζα.

2.5.18 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων μέσω της μεθόδου DNS

Ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων πραγματοποιείται μέσω της φωτομετρικής μεθόδου του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικού οξέος και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ. Όσον αφορά στη διαδικασία της μεθόδου, 0,5 mL δείγματος (αραιωμένου) μαζί με 0,5 mL DNS αναδεύονται και υπόκεινται βρασμό για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε πάγο για 3 λεπτά και έπειτα προστίθενται 5 mL απιονισμένου νερού. Τέλος, η φωτομέτρηση πραγματοποιείται στα 540 nm σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2000 Spectrophotometer. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του δείγματος στα ανάγοντα σάκχαρα είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός πρότυπης καμπύλης αναφοράς (γράφημα 2.4) όπου τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε ισοδύναμα γλυκόζης [Miller, 1959].



Γράφημα 2.4 Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης για τον προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων

2.5.19 Προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Η βιομάζα μετά την ξηρανσή της αλέστηκε (Εικόνα 2.6) καθώς το επόμενο στάδιο ήταν η εκχύλιση και η ποσοτικοποίηση του μικροβιακού λίπους. Στην αλεσμένη βιομάζα προστέθηκαν περίπου 25 mL διαλύματος Folch (χλωροφόρμιο-μεθανόλη αναλογίας 2:1) [Folch et al 1957] και το δείγμα παρέμεινε σε σκοτεινό μέρος για 3-4 μέρες ώστε να αποφευχθεί η οξειδωση των λιπαρών οξέων του ενδοπολυσακχαρικού λίπους. Το χλωροφόρμιο έχει την ιδιότητα να παίρνει το λίπος ενώ η μεθανόλη να σπάει τους δεσμούς. Μετά το πέρας των 4 ημερών, το δείγμα υφίσταται διήθηση και το υπερκείμενο συλλέγεται σε προζυγισμένη ογκομετρική φιάλη. Η φιάλη τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα (BUCHI Waterbath B-480, BUCHI Rotavapor R-114) με στόχο την εξάτμιση του διαλύτη. Εφόσον έχει εξατμιστεί ο διαλύτης, στην φιάλη έχει παραμείνει το μικροβιακό λίπος, όπου προσδιορίζεται βαρυμετρικά.



Εικόνα 2.6 Άλεση της βιομάζας προς προσδιορισμό του λίπους

2.5.20 Μεθυλεστεροποίηση

Η ανάλυση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στο μικροβιακό λίπος διεξάγεται με την μετατροπή τους σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων μέσω μεθυλεστεροποίησης τους με μεθοξείδιο νατρίου ακολουθούμενη από εστεροποίηση με μεθανόλη, με τη χρήση HCl ως καταλύτη. Πιο αναλυτικά, στην προζυγισμένη σφαιρική φιάλη με το μικροβιακό λίπος προστίθενται 2-3 πέτρες βρασμού και 10 mL MeONa και πραγματοποιείται η τοποθέτησή τους σε κάθετο ψυκτήρα υπό βρασμό για 20 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται υδροχλωρική μεθανόλη έως ότου το δείγμα να αποχρωματιστεί και αφήνεται για 20 λεπτά υπό βρασμό. Μετά το πέρας του χρόνου, η αντίδραση λαμβάνει τέλος με την προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι το χρώμα να γίνει γαλακτερό. Το δείγμα μεταφέρεται σε εκχυλιστική χοάνη μαζί με 6ml εξανίου όπου ανακινούνται. Σχηματίζονται 2 φάσεις, η πάνω που αποτελεί την οργανική φάση

με τους εστέρες των λιπαρών οξέων και η κάτω την υδατική. Συλλέγεται η οργανική φάση σε φιαλίδιο, με ελάχιστη ποσότητα άνυδρου θεικού νατρίου (Na_2SO_4) ώστε να απορροφηθεί η υγρασία του δείγματος.

2.5.21 Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία

Η οργανική φάση που συλλέχθηκε από το στάδιο της μεθυλεστεροποίησης θα αναλυθεί σε αέριο χρωματογράφο με στόχο να προσδιοριστεί η σύσταση των επιμέρους λιπαρών οξέων. Απαιτούνται 1-2 μl δείγματος τα οποία με ειδική σύριγγα θα εγχυθούν στον αέριο χρωματογράφο. Η έκπλυση της σύριγγας πραγματοποιείται με διαλύτη εξανίου. Ο αέριος χρωματογράφος Fisons 8060 αποτελείται από μια χρωματογραφική στήλη ($60 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$) και από έναν ανιχνευτή FID. Τα φέροντα αέρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι το He (ροή 2 mL/min), H_2 (60 kPa), O_2 (120 kPa). Η ανάλυση πραγματοποιείται στους 200°C , με την έγχυση στους 240°C και τον ανιχνευτή στους 250°C . Για την ταυτοποίηση των χρόνων κατακράτησης των λιπαρών οξέων του κάθε δείγματος, είχαν περαστεί προηγουμένως πρότυπα διαλύματα που περιείχαν τους μεθυλεστέρες των βασικότερων λιπαρών οξέων. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του κάθε λιπαρού οξέος υπολογίζεται από το εμβαδόν της εκάστοτε κορυφής του χρωματογραφήματος και εκφράζεται σε ποσοστό ως προς το σύνολο των λιπαρών οξέων [Tsakona et al., 2014].

2.5.22 Προσδιορισμός του δείκτη ακορεστότητας των λιπαρών οξέων (UI)

Μετά την ανάλυση του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο υπολογίζεται ο δείκτης ακορεστότητας των λιπαρών οξέων. Ο δείκτης ακορεστότητας εκφράζει το πόσο ακόρεστο είναι το λιπίδιο. Ως ακόρεστα λιπαρά αναφέρονται τα λιπαρά τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερους διπλούς δεσμούς, στην περιπτώσή μας το παλμιτελαϊκό οξύ και το ελαϊκό με ένα διπλό δεσμό, το λινελαϊκό οξύ με 2 διπλούς και το γ-λινολενικό με 3 διπλούς δεσμούς. Όσο μεγαλύτερη η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο μεγαλύτερος θα είναι και ο δείκτης ακορεστότητας σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο [Kates and Baxter, 1962]

$$UI = \frac{\% \text{μονοακόρεστων} + 2 * \% \text{διαακόρεστων} + 3 \% \text{τριακόρεστων}}{100}$$

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Αποτελέσματα Σύστασης

Χάρη στις βιοδραστικές ουσίες που βρίσκονται στη σύσταση πολλών λαχανικών όπως και του μπρόκολου, είναι πολύ σημαντικός ο προσδιορισμός της βιοχημικής τους σύστασης και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους καθώς μπορούν να αξιοποιηθούν σε μελλοντικές εφαρμογές (π.χ. βελτίωση θρεπτικών ιδιοτήτων σε αρτοσκευάσματα) [Campas-Bayroli et al., 2009].

Όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες των φύλλων μπρόκολου, η τιμή του pH μετρήθηκε $5,41 \pm 0,01$, ενώ η πυκνοτητα του προσδιορίστηκε $0,97 \text{ g/mL}$.

Για τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης του φυλλώδους μέρους του μπρόκολου, αρχικά υπολογίστηκε το ποσοστό υγρασίας του, το οποίο είναι αρκετά υψηλό και ισούται με $87,43\% \pm 0,003$ του συνολικού του βάρους. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε μέσω της μεθόδου Kjeldahl το ποσοστό αζώτου, το οποίο ανέρχεται στο $4,06\%$, το ποσοστό λίπους το οποίο υπολογίστηκε μέσω soxhlet (5%) επί ξηρού καθώς και το ανόργανο υπόλειμμα τέφρας (13%). Στο υπερκείμενο κλάσμα των πολτοποιημένων φύλλων, υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε ανόργανο φώσφορο που ισούταν με $333,55 \text{ mg/L}$, καθώς και η περιεκτικότητα του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), της οποίας η συγκέντρωση ανερχόταν στα $130,20 \text{ mg/L}$. Στην συνέχεια, έγινε διαχωρισμός και προσδιορισμός των ελεύθερων σακχάρων μέσω της HPLC, όπου προέκυψαν $2,86 \text{ g/100g}$ ξηρού βάρους γλυκόζη, $2,98 \text{ g/100g}$ ξηρού βάρους φρουκτόζη και $0,63 \text{ g/100g}$ ξηρού βάρους σακχαρόζη. Από τον προσδιορισμό των λιγνοκυτταρινούχων συστατικών μέσω της μεθόδου NREL το ποσοστό της κυτταρίνης εκφρασμένο σε β-γλυκάνη ισούται με $24,9\%$ επί του ξηρού βάρους ενώ το ποσοστό της ημικυτταρίνης εκφρασμένο από το άθροισμα ξυλάνης, γαλακτάνης, μαννάνης και αραβινάνης ισούται με $39,86\%$. Όσον αφορά στο σύνολο της λιγνίνης, αποτελεί το $22,45\%$ επί ξηρού βάρους, με την όξινη διαλυτή να ανέρχεται στο $4,93\%$ ενώ την όξινη αδιάλυτη να ανέρχεται στο $17,52\%$. Τέλος, μέσω της συσκευής soxhlet, η εκχύλιση των υδατοδιαλυτών και των οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε στο $26,72\%$ επί του ξηρού βάρους.

Στον παρακάτω Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σύστασης των πολτοποιημένων φύλλων μπρόκολου.

Πίνακας 3.1 Σύσταση μπρόκολου παρούσας μελέτης και βιβλιογραφίας

Σύσταση	Παρούσα Μελέτη	Campas-Baypoli et al, 2009	dos Reis et al.,2015	Fernandes et al., 2017	Alpuche and Paredes-Lopez, 1992	Rosa et al., 2001
pH	5,4±0,0	5,3 ±0,1	-	-	-	-
Υγρασία (% επί ξηρού)	87,4±0,0	85 ±0,8,	90,7±2,7	-	-	-
Πυκνότητα (g/mL)	0,97±0,0	-	-	-	-	-
Λίπος (% επί ξηρού)	5,2±0,3	6,7±0,2	-	-	2,5-4,2	-
Πρωτεΐνες (% επί ξηρού)	24,4±1,0	12,1±0,7	22,6±8,7	52,3	23-32	-
Τέφρα (% επί ξηρού)	13,01±0,0	14,7±0,1	11±2,3	15,4	-	-
IP (mg/100g dry)	333,6±0,0	-	-	-	-	-
FAN (mg/100g dry)	130,2±13,9	-	-	-	-	-
Ελεύθερα σάκχαρα (g/100g dry)						
Γλυκόζη	2,9±0,1	11,3		-	-	0,47-6,4
Σακχαρόζη	0,6±0	2,3	12,5		-	0,72-3,5
Φρουκτόζη	3,0±0,1	7,8		-	-	2,96-6,2
Κυτταρίνη	24,9		-			
Ημικυτταρίνη	39,9		-		-	-
		12,8±0,4		28		
Σύνολο λιγνίνης	22,5		51,2±2,2		-	-
Αδιάλυτη λιγνίνη	17,5	-	50,8±0,2	-	-	-
Διαλυτή λιγνίνη	4,9	-	0,4±0,0	-		-

Η τιμή του pH 5,41±0,01 στη μελέτη μας παρουσιάζει πολύ μικρή απόκλιση με την τιμή 5,31 ±0,05 που αναφέρεται στη μελέτη φύλλων μπρόκολου σύμφωνα με Campas-Baypoli et al., 2009.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία Bhandari and Kwak, 2015 σε μελέτη 3 διαφορετικών ποικιλιών μπρόκολου βρέθηκε ότι το σύνολο των ελεύθερων σακχάρων στο φυλλώδες τμήμα κυμαίνεται μεταξύ 21,4-24,16 g/100g ξηρού βάρους. Πιο αναλυτικά, η περιεκτικότητα σε γλυκόζη υπολογιζόταν μεταξύ 11,2-13,4 g/100g ξηρού βάρους, σε φρουκτόζη 7,82-10,08 g/100g ξηρού βάρους, ενώ σε σακχαρόζη 0,4 με 2,33 g/100g ξηρού βάρους. Σε άλλη ερευνητική μελέτη παρατηρήθηκε πολύ μεγάλη

διακύμανση μεταξύ της συγκέντρωσης των ελεύθερων σακχάρων σε διαφορετικές ποικιλίες αλλά και στη συγκομιδή σε διαφορετικές εποχές. Οι τιμές παρουσιάζουν εύρος 0,47-6,35 g/100g ξηρού βάρους όσον αφορά τη γλυκόζη, 2,96-6,20 g/100g ξηρού βάρους για τη φρουκτόζη και τέλος 0,72-3,54 g/100g ξηρού βάρους για τη σακχαρόζη [Rosa, David and Gomes, 2001].

Η τέφρα αποτελεί σημαντικό συστατικό παρουσία της είναι ουσιαστική σε μεταβολικές λειτουργίες. Το ποσοστό τέφρας που προσδιορίσαμε στη μελέτη μας παρουσιάζει κοντινές τιμές με αυτές τις βιβλιογραφίας. Το αποτέλεσμα συγκρίνεται ευνοϊκά με τους Campas-Baypoli et al., 2009 (14,67 % σε φύλλα μπρόκολου) , Fernades et al. 2017 (15,47 %) και dos Reis et al., 2015 (11 %). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η περιεκτικότητα σε τέφρα ποικίλλει ανάλογα με τα ορυκτά τους εδάφους, το είδος και το τμήμα του φυτού καθώς και το στάδιο της συγκομιδής του συγκεκριμένου λαχανικού.

Το ποσοστό λίπους σε 4 διαφορετικές ποικιλίες μπρόκολου υπολογίστηκε 2,5-4,2 % επί του ξηρού του βάρους σύμφωνα με Solis and Lopez, 1992, ενώ στα φύλλα του μπρόκολου [Campas-Baypoli et al., 2009] υπολογίστηκε $6,72 \pm 0,21$. Στο εύρος των παραπάνω τιμών βρίσκεται και το 5% του λίπους που υπολογίστηκε στη παρούσα μελέτη.

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη εμφανίζει παραπλήσιες τιμές με αυτές της βιβλιογραφίας. Μελέτη σε διαφορετικές ποικιλίες του λαχανικού παρουσίασε εύρος τιμών από 23,2-36 % πρωτεϊνών επί ξηρού [Solis and Lopez, 1992], ενώ σύμφωνα με dos Reis et al., 2015 το ποσοστό ανερχόταν στο 22,6 %. Εν αντιθέσει, υπάρχουν και μελέτες οι οποίες αποκλίνουν (12,13 %) [Campas-Baypoli et al., 2009]

Τα λαχανικά αποτελούν από τις σημαντικότερες πηγές υδατανθράκων, παίζοντας πολύ σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία. Η μέθοδος των ακετέργαστων ινών, μετρά το άθροισμα της λιγνίνης και της κυτταρίνης σύμφωνα με Campas-Baypoli et al., 2009 με το ποσοστό τους 12,83 % επί ξηρού στα φύλλα του μπρόκολου. Ακόμη, συμφωνά με τη μελέτη Solis and Lopez, 1992 παρουσιάζουν διακυμάνσεις (12,6-14,5 %), ενώ βάσει του Matthee and Appledorf, 1978, η κυτταρίνη αποτελεί το 14,23 %, η ημικυτταρίνη το 2,63 % και η λιγνίνη το 1,26 % του συνόλου. Εν αντιθέσει, η έρευνα dos Reis et al., 2015 παρουσιάζει σημαντικές διαφορές καθώς το σύνολο των ινών ανέρχεται στο 51,2 % (διαλυτές 0,4 % , αδιάλυτες 50,8 %).

Εν συνεχεία, μετά την ολοκλήρωση του προσδιορισμού της σύστασης, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των υδατοδιαλυτών και των οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων μέσω Soxhlet. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό των υδατοδιαλυτών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε 26,73 %, ενώ παράλληλα μέσω των αναλύσεων ανόργανου φώσφορου και των ελεύθερων αζώτου αμινομάδων, υπολογίστηκε ο φώσφορος να ισούται με 568 mg/100g ξηρού βάρους, ενώ τα ελεύθερα αζώτου αμινοξέα με 538 mg/100g ξηρού βάρους. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των ελεύθερων σακχάρων μέσω της HPLC δίνοντας 1,68 g/100g ξηρού βάρους γλυκόζη, 1,02 g/100g ξηρού βάρους φρουκτόζη και 0,3 g/100g ξηρού βάρους αραβινόζη. Τέλος, προσδιορίστηκε το ποσοστό των οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων το οποίο ανέρχεται στο 6,74 %. Με την προσθήκη μεθανόλης, υπολογίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μέσω της μεθόδου Folin – Ciocalteu όπου αντιστοιχεί στα 350 mg/100g ξηρού βάρους, καθώς και προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική του ικανότητα που ήταν αρκετά χαμηλή (0,01AAI). Η ποσότητα δείγματος που απέμεινε ξηράθηκε, με σκοπό τον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου μέσω της μεθόδου Kjeldahl (%N 4,26 %).

Στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 3.2, 3.3), παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τόσο των υδατοδιαλυτών όσο και των οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων μέσω Soxhlet.

Πίνακας 3.2 Ανάλυση υδατοδιαλυτών εκχυλισμάτων

Υδατοδιαλυτά Εκχυλίσματα	
Βάρος (g/100g ξηρού βάρους)	26,73
FAN (mg/100g ξηρού βάρους)	538,30 ± 7,16
IP (mg/100g ξηρού βάρους)	568,45 ± 0,0
Ελεύθερα Σάκχαρα (mg/100g ξηρού βάρους)	
Γλυκόζη	1,68
Φρουκτόζη	1,02
Αραβινόζη	0,3

Πίνακας 3.3 Ανάλυση οργανικά διαλυτών εκχυλισμάτων

Οργανικά Διαλυτά Εκχυλίσματα	
Βάρος (g/100g ξηρού βάρους)	6,74
Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο	350,56±3,80
Αντιοξειδωτική Ικανότητα (AAI)	0,01
Άζωτο (%)	4,26±0,03

Η ολική φαινολική περιεκτικότητα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μπορεί να παρουσιάσει μεγάλο εύρος τιμών. Μελέτη των dos Reis et al., 2015, αποδεικνύει ότι το μπρόκολο περιέχει 987 mg GAE/100g ξηρού. Επιπροσθέτως, βάσει Bhandari and Kwak, 2015, σε διαφορετικές ποικιλίες μπρόκολου, διαπιστώθηκε ότι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των φύλλων μπορεί να διακυμαίνεται μεταξύ 533,60-740,10 mg/100g ξηρού.

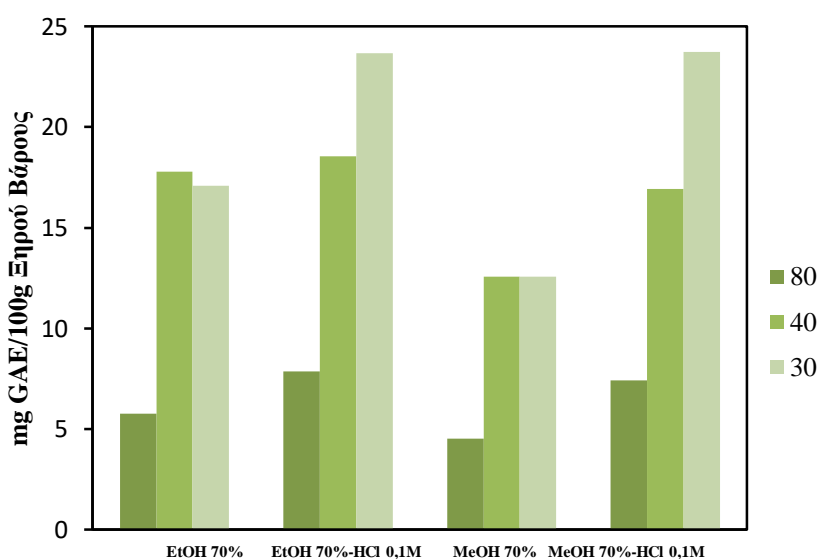
Συνοψίζοντας, συμπαιρένουμε σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία, ότι η ποιότητα και η θρεπτική αξία του μπρόκολου εξαρτάται από τους παράγοντες της ανάπτυξης, το στάδιο ωρίμανσης, την ποικιλία, τη συγκομιδή, την άρδευση καθώς και τη λίπανση. Τα υψηλά ποσοστά αζώτου μέσω των λιπασμάτων επιδρούν στην παραγωγή μειωμένης ξηρής μάζας καθώς και στην αύξηση της απόδοσης παραγωγής του μπρόκολου. Ακόμη τα υψηλά επίπεδα αζωτούχων λιπασμάτων μπορούν να επηρεάσουν την περιεκτικότητα των σακχάρων, του φωσφόρου αλλά, των φυτικών ινών [Babik and Elkner, 2002, Hasperué, Chaves and Martínez, 2011, Yildirim et al., 2007, Aires, 2006, Sorensen, 1999].

3.2 Αποτελέσματα Βιοδιωλιστηρίου

3.2.1 Εκχύλιση αντιοξειδωτικών

Η εκχύλιση φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους ώστε να διαπιστωθεί ποια θα παρουσιαζόταν ως η πιο αποδοτική, χωρίς απώλειες άλλων συστατικών. Η πρώτη μέθοδος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση επωαστήρα υπό ανάδευση για δυο ώρες στους 30°C. Ως διαλύτες επιλέχθηκαν αιθανόλη, οξιμισμένη αιθανόλη, μεθανόλη και οξιμισμένη μεθανόλη σε αναλογία 1:80 w/v, 1:40 w/v, 1:30

w/v. Μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου παρουσιάστηκε μειωμένη εκχύλιση αντιοξειδωτικών. Αυτό διαπιστώθηκε μέσω της ανάλυσης Folin–Ciocalteu, όπου τα αποτελέσματα ολικής περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών ήταν αρκετά χαμηλά. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών παρουσιάστηκαν σε αναλογία 1:30 w/v στο διαλύτη της οξινισμένης μεθανόλης και οξινισμένης αιθανόλης σε συγκέντρωση 23,71 mg/100g επί ξηρού και 23,67 mg/100g επί ξηρού, αντίστοιχα, ενώ οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις εμφανίστηκαν στην αναλογία 1:80w/v στη μεθανόλη και στην αιθανόλη (4,50 mg/100g επί ξηρού, 5,77 mg/100g επί ξηρού, αντίστοιχα). Στο γράφημα 3.1 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών στους 4 διαφορετικούς διαλύτες με τις 3 διαφορετικές αραιώσεις.



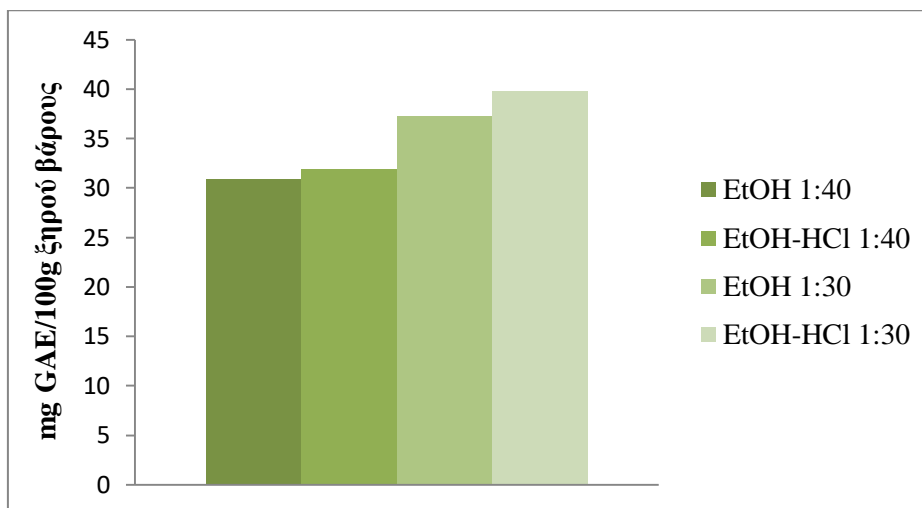
Γράφημα 3.1 Σύγκριση διαλυτών διαφορετικών αναλογιών ως προς την συγκέντρωση φαινολικών, σε επωαστήρα υπό ανάδευση

Ακόμη, κατά την ανάλυση, μέσω της HPLC, των υπερκειμένων μετά την εκχύλιση, παρατηρήθηκε σε μικρό βαθμό εκχύλιση ελεύθερων σακχάρων, με ελάχιστα μεγαλύτερη συγκέντρωση να εμφανίζεται στην αραιώση 1:40 w/v τόσο της αιθανόλης όσο και της οξινισμένης αιθανόλης. Στον πίνακα 3.4 εμφανίζεται η συγκέντρωση των σακχάρων.

Πίνακας 3.4 Συγκέντρωση εκχυλιζόμενων ελεύθερων σακχάρων (g/100g ξηρού)

Αραίωση	Διαλύτης	Γλυκόζη	Φρουκτόζη
1:40	EtOH	2,92	0,51
	EtOH-HCl	2,9	0,58
1:80	EtOH	2,78	0,4
	EtOH-HCl	2,75	0,57

Η δεύτερη μέθοδος πραγματοποιήθηκε με υδατόλουτρο υπερήχων σε δύο χρόνους, 30 και 45 λεπτά ώστε να διαπιστώσουμε που θα είχαμε την μεγαλύτερη εκχύλιση αντιοξειδωτικών. Ως διαλύτες επιλέξαμε την αιθανόλη και την οξινισμένη αιθανόλη σε αναλογία, 1:40 w/v και 1:30 w/v. Δεν επιλέχθηκε η μεθανόλη ως διαλύτης καθώς δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο στα τρόφιμα. Μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου δώθηκαν καλύτερα αποτελέσματα, καθώς οι συγκεντρώσεις της ολικής φαινολικής περιεκτικότητας ήταν μεγαλύτερες συγκριτικά με της πρώτης μεθόδου (ανάλυση Folin– Ciocalteu). Επιπροσθέτως, ο χρόνος ο οποίος απέδωσε μεγαλύτερη εκχύλιση αντιοξειδωτικών ήταν τα 45 λεπτά. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμφανίζονται σε αναλογία 1:30 w/v, τόσο στο διάλυμα της αιθανόλης όσο και της οξινισμένης αιθανόλης με τιμές 37,33 g/100g ξηρού βάρους και 39,77 gr/100g ξηρού βάρους, αντίστοιχα. Όμως σαν προτιμότερος διαλύτης για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών επιλέχθηκε η αιθανόλη καθώς οι τιμές ήταν παραπλήσιες με αυτές της οξινισμένης αιθανόλης (γράφημα 3.2), ώστε να αποφύγουμε την κατανάλωση HCl.



Γράφημα 3.2 Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών με τη χρήση υπερήχων

Όσον αφορά στη διαδικασία του βιοδιωλιστηρίου, το αρχικό βάρος του πολτού μπρόκολου ήταν 100 g ξηρού. Με την ολοκλήρωση της διεργασίας των υπερήχων, διαχωρίστηκαν το ίζημα με το υπερκείμενο, όπου στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η εξάτμιση του υγρού. Το στερεό υπόλειμμα το οποίο παρέμεινε μετά την εξάτμιση και αποτελεί την ποσότητα που ουσιαστικά εκχυλίστηκε από το διαλύτη EtOH 1:30 w/v, ισούται με 19,45 g ξηρού βάρους. Στα 19,45 g προστέθηκε διαλύτης MeOH, όπου μέσω της ανάλυσης Folin –Ciocalteu προσδιορίστηκε ότι μόνο τα 1,75g αποτελούν τη συνολική φαινολική περιεκτικότητα, ενώ μέσω της ανάλυσης DPPH προσδιορίστηκε ο δείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας αρκετά ικανοποιητικός (0,06AAI).

3.2.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών

Στο ίζημα το οποίο παρέμεινε από την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών, με βάρος 80,55g επί ξηρό, πραγματοποιήθηκε η κατακρήμιση των πρωτεϊνών. Στο πρώτο στάδιο όπου ρυθμίστηκε η τιμή του pH στο 10 με διάλυμα NaOH 10M πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός ιζήματος και υπερκειμένου. Το βάρος του ιζήματος ανερχόταν στα 77,6 g ξηρού βάρους. Στο υπερκείμενο που παρέμεινε, πραγματοποιήθηκε πτώση του pH στο 3,8 με στόχο την κατακρήμιση των πρωτεϊνών. Για να απομονώσουμε το στερεό υπόλειμμα (πρωτεΐνες) πραγματοποιήθηκε εξάτμιση του υγρού, όπου μετά το πέρας της διαδικασίας, οι πρωτεΐνες υπολογίστηκαν 2,98 g (ξηρό βάρος).

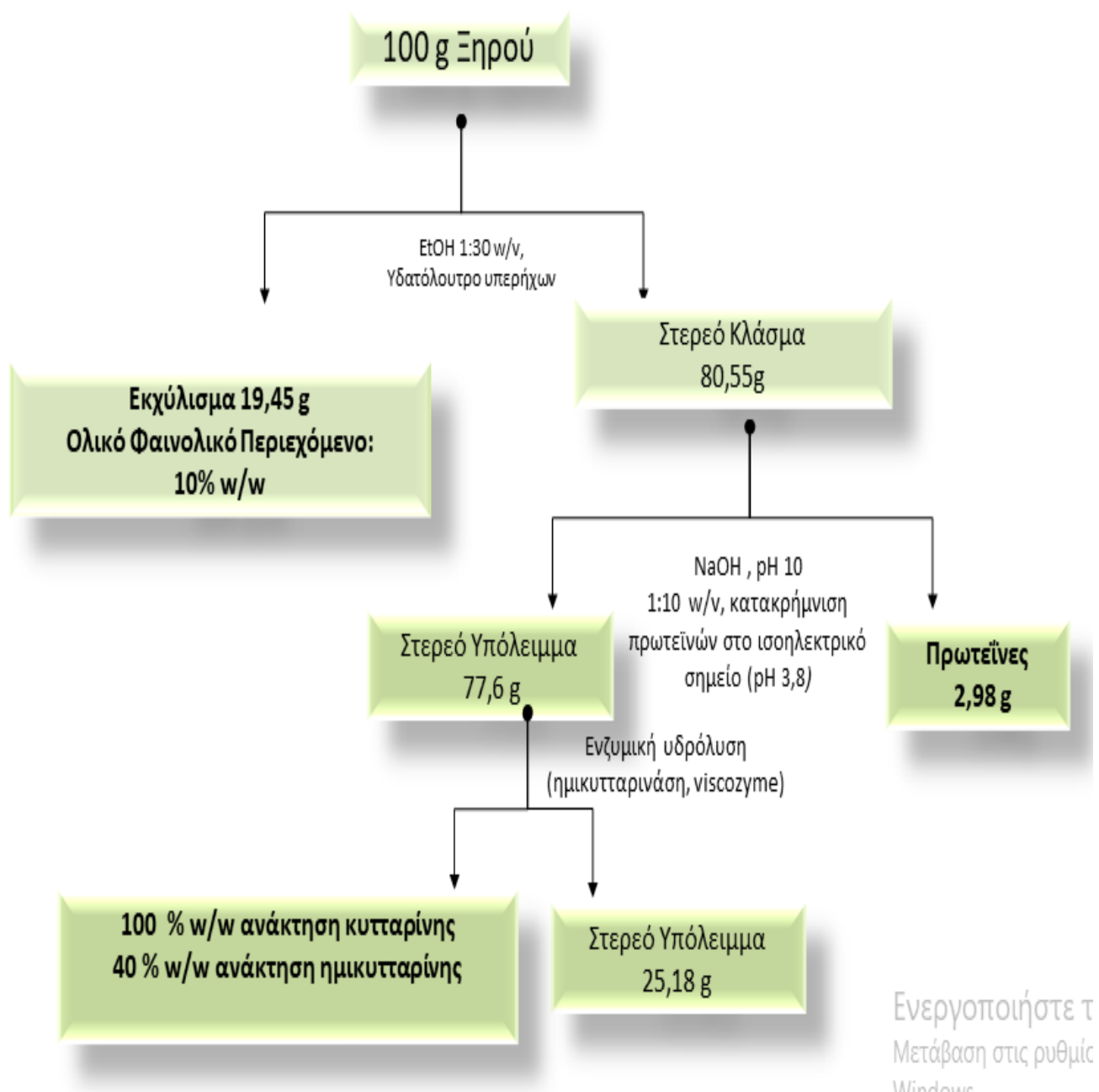
3.2.3 Υδρόλυση

Στα 77,6 g ξηρού βάρους τα οποία απέμειναν από την εκχύλιση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε η διαδικασία υδρόλυσης των πολυσακχαριτών. Οι συνθήκες υδρόλυσης πρέπει να αποφεύγεται να είναι ισχυρές καθώς μέρος της γλυκόζης που προκύπτει από την υδρόλυση της κυτταρίνης, μετατρέπεται σε οργανικά οξέα ή φουρφουράλης και υδροξυμεθυλφουρφουράλης, μειώνοντας έτσι το ποσοστό υδρόλυσης (hydrolysisyield). Με την προσθήκη των ενζύμων της ημικυτταρινάσης και του viscozyme πραγματοποιήθηκε υδρόλυση τόσο της ημικυτταρίνης όσο και της κυτταρίνης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα το υδρόλυμα να αποτελείται από 6,11 g ξυλόζη, 6,6 g γαλακτόζη, 3,77 g αραβινόζη, 23,56 g γλυκόζη . Τέλος, το υδρόλυμα περιείχε και 2,35 g σακχαρόζη. Με βάση τα αποτελέσματα της υδρόλυσης παρατηρούμε ότι πήραμε τη μέγιστη ποσότητα γλυκόζης από την κυτταρίνη καθώς μέσω της μεθόδου NREL παρατηρήθηκε ότι αποτελεί το 24% επί ξηρού. Εν αντιθέσει, από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης, πήραμε μόνο 16,54 g σακχάρων, με απόδοση 41,49 % από την αναμενόμενη ποσότητα σακχάρων σύμφωνα με την NREL. Πιο αναλυτικά, το 37 % της ημικυτταρίνης αποτελείται από ξυλόζη, το 40 % από γαλακτόζη και το 22 % από αραβινόζη. Το στερεό υπόλειμμα που απέμεινε μετά το πέρας της υδρόλυσης ισούται με 25,18 g. Στον πίνακα 3.5 αναφέρονται οι συγκεντρώσεις των σακχάρων που περιέχονται στο υδρόλυμα καθώς και το ποσοστό του εκάστοτε σακχάρου στο σύνολο των σακχάρων.

Πίνακας 3.5:Συγκέντρωση σακχάρων υδρολύματος μπρόκολου

Σάκχαρο	g/100 g επί ξηρού	% Συνόλου Σακχάρων
Γλυκόζη	23,56	55,58
Σακχαρόζη	2,35	5,54
Ξυλόζη	6,11	14,41
Γαλακτόζη	6,6	15,57
Αραβινόζη	3,77	8,89
Σύνολο	42,39	

Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται συνολικά η διαδικασία του βιοδουλιστηρίου μέσω ισοζυγίου μάζας

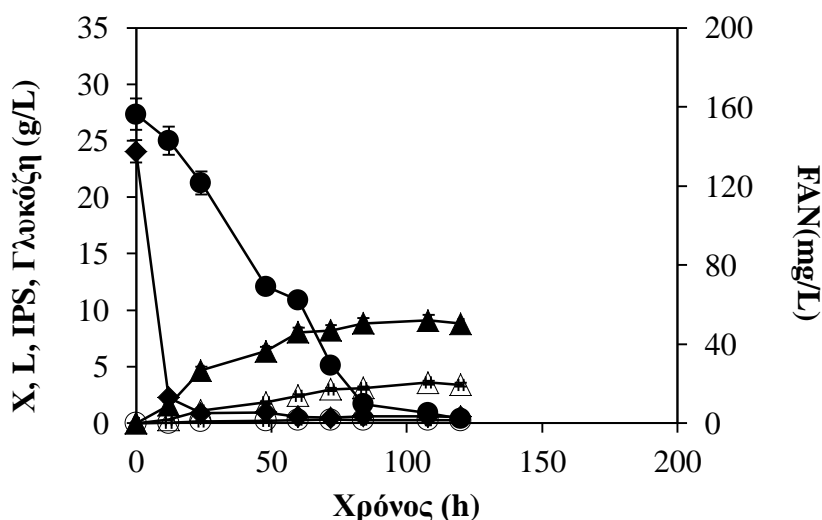


Εικόνα 3.1 Διαγραμματική απεικόνιση ισοζυγίου μάζας στο φυλλώδες τμήμα απόβλητου μπρόκολου

3.3 Μικροβιακές Ζυμώσεις

3.3.1 Υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης

Αρχικά διεξήχθησαν ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας σε κωνικές φιάλες χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη (30 g/L). Όπως φαίνεται στο γράφημα 3.3 η παραγωγή βιομάζας ανήλθε σε 9,10 g/L μετά από 108 ώρες ζύμωσης.



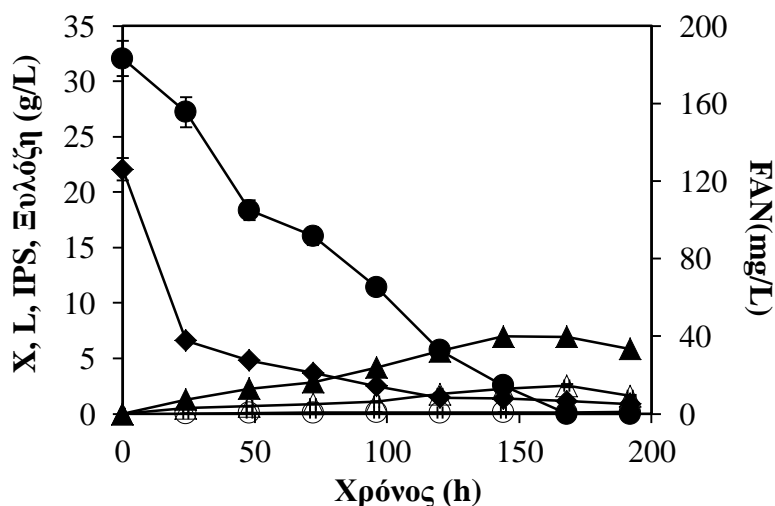
Γράφημα 3.3 Κατανάλωση γλυκόζης (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινοομάδων (◆) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ)(L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας

Η κατανάλωση της γλυκόζης από το μικροβιακό στέλεχος γίνεται με γρήγορο ρυθμό μέχρι τις 84 ώρες και εν συνεχεία ο ρυθμός κατανάλωσης βαίνει μειούμενος μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Η λιποσυσσώρευση ξεκινάει μετά τις 12 h, με ταυτόχρονη εξάντληση της πηγής αζώτου (12,92 mg/L), παρουσιάζοντας μέγιστη συγκέντρωση ίση με 3,60 g/L μετά από 108 h. Στον ίδιο χρόνο επιτεύχθηκαν μέγιστες τιμές λιποπεριεκτικότητας (39,56 %) και παραγωγικότητας (0,8 g/L/d) της μικροβιακής ζύμωσης. Όσον αφορά στη συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (Γράφημα 3.3)

παρατηρείται ότι η ενδοκυτταρική τους συσσώρευση κυμαίνεται σε χαμηλές τιμές καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης (0,03-0,31 g/L).

3.3.2 Υπόστρωμα συνθετικής ξυλόζης

Το Γράφημα 3.4 παρουσιάζει ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας που διεξήχθησαν έχοντας ως πηγή άνθρακα εμπορική ξυλόζη, συγκέντρωσης 30 g/L.

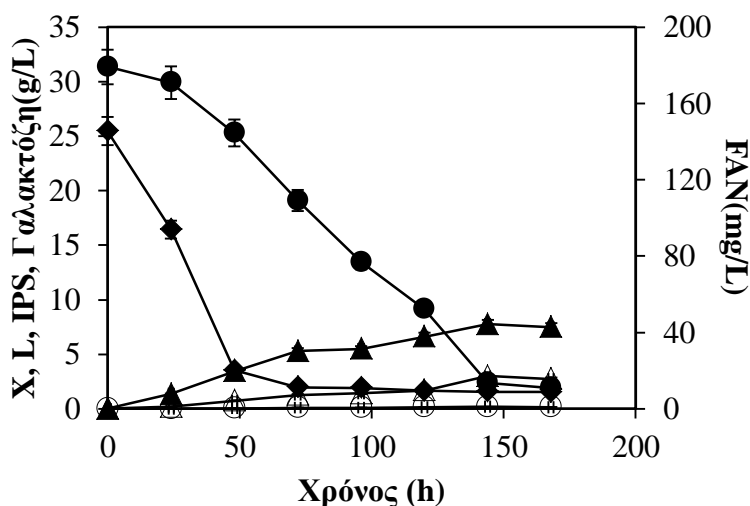


Γράφημα 3.4 Κατανάλωση ξυλόζης (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (♦) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ)(L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας

Όπως παρατηρείται από τα δεδομένα, η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας ανέρχεται στα 6,95 (g/L) στις 168 h της μικροβιακής ζύμωσης. Η εξάντληση της περιεχόμενης στο θρεπτικό μέσο ξυλόζης στις 168 h σηματοδότησε το τέλος της ζύμωσης. Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους άρχισε να αυξάνεται, αφού η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων μειώθηκε σημαντικά εντός των 24 h. Μετά τις 168 h ζύμωσης, μέγιστη συγκέντρωση λιπιδίων, λιποπεριεκτικότητα και παραγωγικότητα σημειώθηκαν με αντίστοιχες τιμές 2,53 g/L, 36,54% και 0,36 g/L/d. Τέλος, δεν σημειώθηκε σημαντική συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών, με συγκεντρώσεις να διατηρούνται σε χαμηλές τιμές, εύρους 0,02-0,15 g/L.

3.3.3 Υπόστρωμα συνθετικής γαλακτόζης

Ακολούθησε ζύμωση κλειστής καλλιέργειας με πηγή άνθρακα την γαλακτόζη. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.5, σημειώθηκε σημαντική παραγωγή βιομάζας με τη μέγιστη συγκέντρωση να ανέρχεται στα 7,77 g/L στις 144 h της μικροβιακής ζύμωσης.

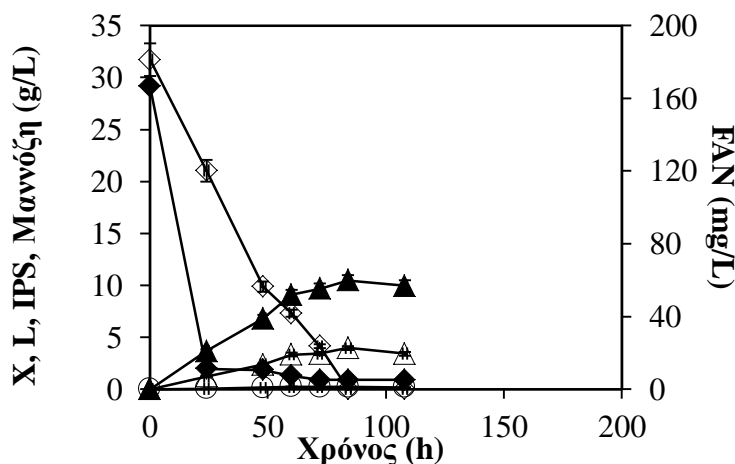


Γράφημα 3.5 Κατανάλωση γαλακτόζης (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινοομάδων (◆) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ)(L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας

Ακόμη, ο ρυθμός κατανάλωσης του σακχάρου μειώνεται με γρήγορο ρυθμό με πλήρη εξάντληση στις 168 h. Καθίσταται εμφανές από το Γράφημα 3.5 ότι με την εξάντληση της πηγής αζώτου στις 48 h, ξεκινάει παράλληλα σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού λίπους με μέγιστη τιμή (2,99 g/L) στις 144 ώρες ζύμωσης. στον ίδιο χρόνο ζύμωσης, αντίστοιχες τιμές λιποπεριεκτικότητας, απόδοσης και παραγωγικότητας ήταν 38,48 %, 0,10 g/g και 0,50 g/L/d. Η συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών διατηρήθηκε σε χαμηλές τιμές καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης με διακύμανση τιμών μεταξύ 0,05-0,15 g/L.

3.3.4 Υπόστρωμα συνθετικής μαννόζης

Στην συνέχεια, αξιολογήθηκε η μαννόζη ως θρεπτικό υπόστρωμα για την αποτελεσματική παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Όπως παρατηρείται (Διάγραμμα 3.6), σημειώθηκε σημαντική κυτταρική αύξηση με μέγιστη παραγωγή βιομάζας 10,48 g/L, ύστερα από 84 ώρες ζύμωσης.



Γράφημα 3.6 Κατανάλωση μαννόζης (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινοομάδων (◆) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ)(L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας

Ακόμη, παρατηρήθηκε γρήγορος ρυθμός κατανάλωσης της μαννόζης από το μικροβιακό στέλεχος μέχρι τις 50 ώρες και ακολούθως ο ρυθμός μειώθηκε έως εξάντλησης της πηγής άνθρακα στις 108 ώρες ζύμωσης. Η μέγιστη συγκέντρωση λιπιδίων ίση με 3,97 g/L επιτεύχθηκε στις 84 h, με ποσοστό επί της παραγόμενης βιομάζας 37,86 %, και παραγωγικότητα 1,13 g/L/d. Τέλος, η συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών, μέχρι τις 108 ώρες που εξαντλήθηκε η πηγή άνθρακα, διατηρήθηκε χαμηλή (0,06-0,26 g/L).

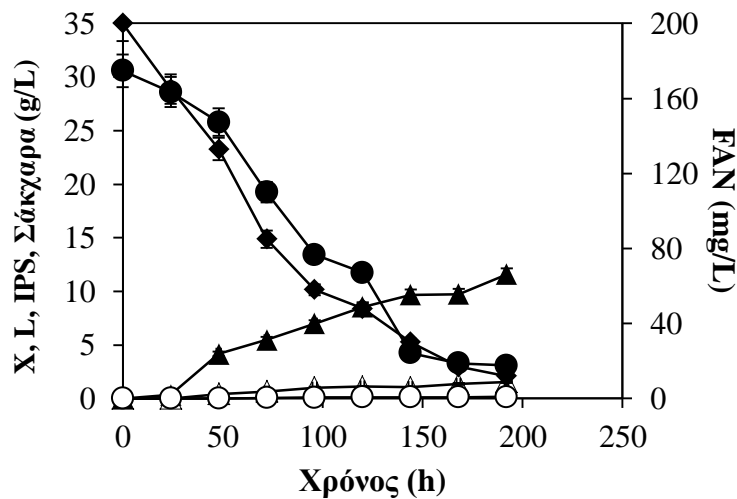
3.3.5 Υπόστρωμα συνθετικής αραβινόζης

Όσον αφορά στις ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας που διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα εμπορική αραβινόζη (15,30 g/L), παρατηρήθηκε ότι το μικροβιακό στέλεχος δεν αφομίωσε ικανοποιητικά το

συγκεκριμένο σάκχαρο καθώς η κατανάλωση του σακχάρου ήταν βραδεία με αποτέλεσμα στις 10 μέρες η συγκέντρωση να μειωθεί ελάχιστα (18 %). Πιο αναλυτικά, σε αυτό το χρονικό διάστημα η ποσότητα βιομάζας που παράχθηκε ήταν αρκετά χαμηλή με συγκέντρωση 0,26 g/L και αντίστοιχα πολύ χαμηλή συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους (0,05 g/L). Παράλληλα και το ποσοστό λίπους ως προς τη βιομάζα ήταν σημαντικά χαμηλό (20 %). Ακόμη, η απόδοση του ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την κατανάλωση του σακχάρου αγγίζει μόνο το 0,03. Το γεγονός ότι δεν παράχθηκε ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους μπορεί να συσχετιστεί με την περιορισμένη κατανάλωση της πηγής του αζώτου στο περιβάλλον της ζύμωσης. Η μικροβιακή ζύμωση ξεκίνησε με 76 mg/L και έφτασε μόλις τα 60 mg/L την δέκατη μέρα. Ο υπολογισμός των ενδοπολυσακχαριτών δεν πραγματοποιήθηκε καθώς η ποσότητα της παραγόμενης βιομάζας ήταν αρκετά μικρή.

3.3.6 Υπόστρωμα προερχόμενο από υδρόλυμα απόβλητου λαχανικού

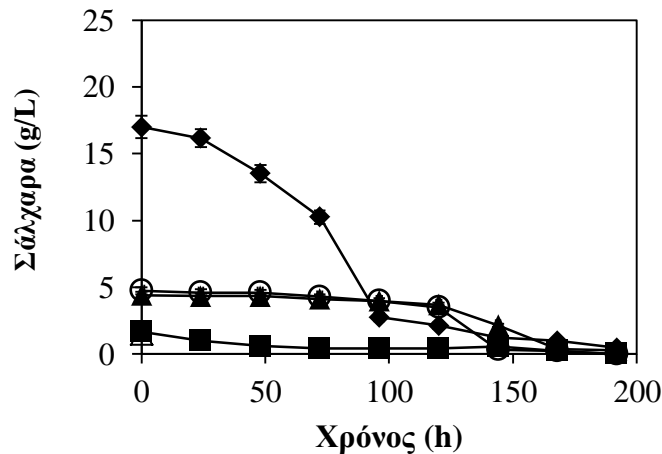
Έπειτα, το υδρόλυμα το οποίο προήλθε από την ενζυμική υδρολύση του φυλλώδους μέρους του μπρόκολου διευρύνθηκε ως προς την επάρκεια και δυναμική του να υποστηρίξει ικανοποιητική ανάπτυξη της μυκητιακής βιομάζας σε συνδυασμό με αποτελεσματική παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Από το Γράφημα 3.7 παρατηρείται ότι η κυτταρική αύξηση ξεκινάει μετά τις 24 ώρες της μικροβιακής ζύμωσης, με μέγιστη παραγωγή βιομάζας 11,60 g/L στις 192 h.



Γράφημα 3.7: Κατανάλωση σακχάρων (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινοομάδων (◆) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ)(L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας με υπόστρωμα προερχόμενο από υδρόλυμα απόβλητου λαχανικού

Ο ρυθμός κατανάλωσης των περιεχόμενων στο θρεπτικό μέσο σακχάρων, ήταν χαμηλός, με εξάντλησή τους στις 192 h. Ακόμη, παρατηρείται ότι η κατανάλωση του αζώτου ήταν βραδεία με απόρροια την περιορισμένη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους (13,96 %) εντός των μυκηλιακών δομών, με μέγιστη συγκέντρωση 1,56 g/L στο τέλος της ζύμωσης. Στις 192 h η παραγωγικότητα ανήλθε στην μέγιστη της ίση με 0,25 g/L/d (192 h). Η συσσώρευση των ενδοπολυσακχαριτών ήταν σχεδόν μηδενική, με πολύ χαμηλές τιμές (0,11-0,16 g/L) συγκέντρωσης να υπολογίζονται μετά τις 120 h.

Ως προς την κατανάλωση των επιμέρους σακχάρων, σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.8 παρατηρείται ότι η γλυκόζη καταναλώθηκε πρώτη από το μικροβιακό στέλεχος ακολουθώντας γρήγορο ρυθμό.

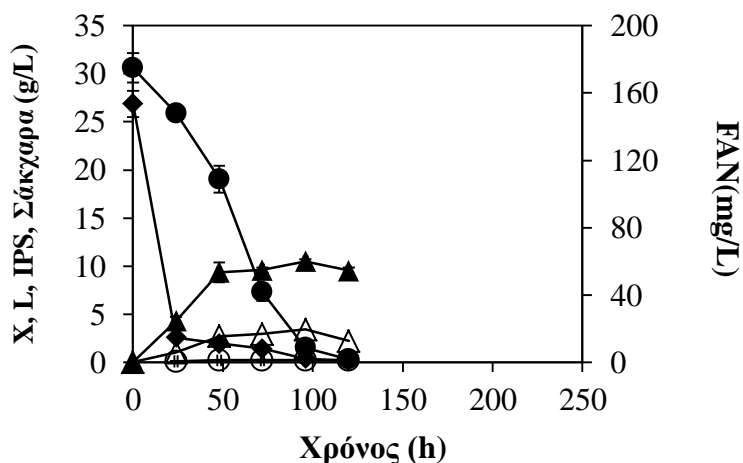


Γράφημα 3.8 Κατανάλωση γλυκόζης (◆) (g/L), ξυλόζης (▲) (g/L), γαλακτόζης (○) (g/L), αραβινόζης (Δ) (g/L) και σακχαρόζης (■) (g/L) συναρτήσεως του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας με υπόστρωμα προερχόμενο από υδρόλυμα απόβλητου λαχανικού

Μετά τις 96 h μικροβιακής ζύμωσης, άρχισε και η κατανάλωση της γαλακτόζης και της ξυλόζης με παρόμοιο ρυθμό φτάνοντας στη πλήρη κατανάλωση τους στις 192 h. Η συγκέντρωση της αραβινόζης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρέμεινε σχεδόν σταθερή καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης ενώ η σακχαρόζη ήταν η μόνη πηγή άνθρακα που καταναλώθηκε στις 48 h.

3.3.7 Υπόστρωμα με εμπορικά σάκχαρα, προσομοιωμένο στα σάκχαρα του απόβλητου

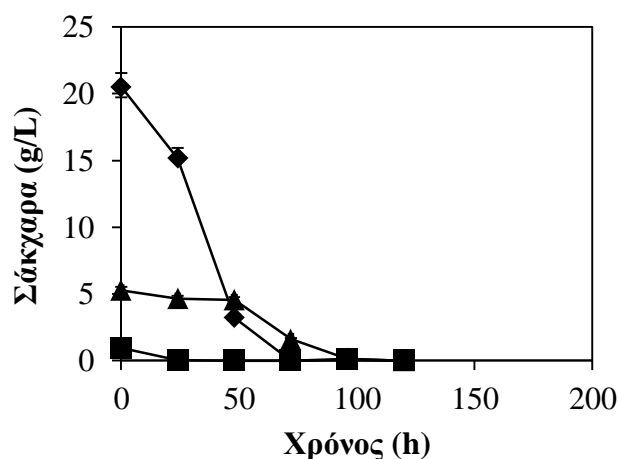
Σε αυτό το στάδιο της μελέτης πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα θρεπτικό υπόστρωμα προσομοιωμένο σύμφωνα με τη σύσταση του υδρολύματος απόβλητου μπρόκολου (Διάγραμμα 3.9).



Γράφημα 3.9 Κατανάλωση σακχάρων (●) (g/L), αζώτου ελεύθερων αμινοομάδων (◆) (mg FAN/L), καθώς και παραγωγή βιομάζας (▲) (X, g/L), ενδοκυτταρικού λίπους (Δ) (L, g/L), και ενδοπολυσακχαριτών (○) (IPS, g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας σε υπόστρωμα με εμπορικά σάκχαρα, προσομοιωμένο στα σάκχαρα του απόβλητου

Η παραγωγή της βιομάζας παρουσιάζει σημαντική αύξηση με μέγιστη συγκέντρωση 10,5 g/L στις 96 h της ζύμωσης. Ακόμη, η κατανάλωση του υποστρώματος ήταν ταχεία, με την εξάντληση της στις 96 h, να σηματοδοτεί το τέλος της ζύμωσης. Η συγκέντρωση αζώτου μειώθηκε σημαντικά εντός των 24 h, χρόνος στον οποίο ξεκίνησε η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση να ανέρχεται στα 3,42 g/L (96 h). Στο διάστημα των 96 h παρατηρήθηκε και η μέγιστη λιποπεριεκτικότητα με ποσοστό 32,60 % και παραγωγικότητα 0,85 (g/L/d). Τέλος, δεν παρουσιάστηκε σημαντική συσσώρευση των ενδοπολυσακχαριτών, παρουσιάζοντας εύρος τιμών στη συγκέντρωσή τους 0,09-0,2 g/L.

Όσον αφορά την κατανάλωση των σακχάρων από το Γράφημα 3.10 παρατηρείται υψηλός ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης μέχρι τις 48 h της ζύμωσης και εν συνεχεία ο ρυθμός βαίνει μειούμενος μέχρι εξάντλησής της στις 96 h.



Γράφημα 3.10 Κατανάλωση γλυκόζης (♦) (g/L), ξυλόζης(▲) (g/L) και σακχαρόζης (■) (g/L) συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης (h) χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας

Παράλληλα, στις 48 h ξεκίνησε η κατανάλωση της ξυλόζης καθώς προηγουμένως η συγκέντρωσή της παρέμενε σταθερή. Τέλος, είναι εμφανές από το γράφημα ότι η εξάντληση της σακχαρόζης πραγματοποιήθηκε μέσα σε 24 h.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που έλαβαν χώρα με υπόστρωμα το υδρόλυμα του απόβλητου και τα προσομοιωμένα στο υδρόλυμα συνθετικά σάκχαρα παρατηρούνται σημαντικές διαφορές. Η πλήρης κατανάλωση της πηγής άνθρακα στο υδρόλυμα (192 h) πραγματοποιήθηκε στο διπλάσιο χρόνο έναντι των συνθετικών (96 h). Και στις δυο ζυμώσεις ο μικροοργανισμός κατανάλωσε πρώτη την γλυκόζη και ο ρυθμός κατανάλωσής της ήταν αισθητά γρηγορότερος συγκριτικά με την ξυλόζη και τη γαλακτόζη. Εφόσον ολοκληρώθηκε η κατανάλωση της γλυκόζης σε ποσοστό 50 % και 30 % αντίστοιχα για τις 2 ζυμώσεις ξεκίνησε ο καταβολισμός της ξυλόζης. Σε πολλές περιπτώσεις η παρουσία της γλυκόζης στις ζυμώσεις λειτουργεί ως παρεμποδιστικός παράγοντας στην κατανάλωση της ξυλόζης, ενώ ο καταβολισμός της τελευταίας ξεκινά εφόσον καταναλωθεί το προτιμώμενο σάκχαρο (γλυκόζη) [Winkelhausen & Kuzmanova 1998]. Η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους παρουσίασε μεγάλη απόκλιση μεταξύ των 2 ζυμώσεων. Στο υδρόλυμα η παραγωγή του λίπους ξεκίνησε στις 48 h με πολύ χαμηλή συγκέντρωση (0,48 g/L) εν αντιθέσει με τη ζύμωση των συνθετικών, της οποίας η συγκέντρωση στο ίδιο χρονικό διάστημα ανερχόταν στα 2,70 g/L. Να σημειωθεί ότι το άζωτο είχε εξαντληθεί στις 24 h στη δεύτερη ζύμωση, ενώ

στη ζύμωση του υδρολύματος ο ρυθμός κατανάλωσης του αζώτου ήταν αρκετά χαμηλός, γεγονός που συνάδει με τα παραπάνω δεδομένα. Όσον αφορά στην κυτταρική αύξηση δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές καθώς και στις 2 περιπτώσεις σημειώθηκε σημαντική παραγωγή βιομάζας. Βάσει των συγκεκριμένων δεδομένων, μπορούμε να υποθέσουμε ότι στηρίζεται στη θεωρία πως η υψηλή συγκέντρωση αζώτου στο θρεπτικό μέσο έχει ως αποτέλεσμα να ευνοεί την παραγωγή της βιομάζας (πρωτογενής μεταβολισμός), εν αντιθέσει με το ενδοκυτταρικό λίπος του οποίου η παραγωγή περιορίζεται [Certik, Megona and Horenitzky, 1999, Fakas et al., 2008].

3.3.8 Σχολιασμός αποτελεσμάτων από αέριο χρωματογράφο (GC)

Στον πίνακα 3.6 παρουσιάζεται το προφίλ των λιπαρών οξέων των μικροβιακών λιπιδίων.

Πίνακας 3.6 Προφίλ των λιπαρών οξέων των μικροβιακών ζυμώσεων που διεξήχθησαν με το μυκητιακό στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411

Πηγή C	Χρόνος (ώρες)	Μεθυλεστέρες Λιπαρών Οξέων(%w/w)								UI
		C14:0	Δ^9 C14:1	C 16:0	Δ^7 C16:1	C 18:0	Δ^9 C 18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3	
Γλυκόζη	24	2,3		16,5	0,5	8,6	39,7	13,5	18,3	1,22
	84	0,5	0,1	16,0	0,5	9,6	49,3	11,7	12,2	1,10
	120	0,4	0,1	16,8	0,7	4,8	50,5	12,0	14,8	1,2
Ξυλόζη	72			24,2	1,0	5,3	37,3	18,6	13,6	1,16
	120			20,7	1,1	5,2	41,3	16,5	15,2	1,21
	168	0,9	0,4	21,4	0,9	6,3	37,7	16,9	15,5	1,19
Γαλακτόζη	72	0,7	0,9	16,1	0,5	10,6	43,9	13,4	13,9	1,13
	120	0,7	0,3	18,1	0,5	7,5	39,0	15,5	18,3	1,25
	144	0,6	0,1	16,4	0,6	10,8	49,0	10,5	12,0	1,07
Μαννόζη	24			22	0,9	6,8	43,7	13,0	13,7	1,12
	84	0,4	0,1	15,3	0,2	4,5	50,8	13,6	15,2	1,24
	120				0,9	4,8	58,1	16,6	19,6	1,51
Αραβινόζη	240			24,3		15,6	40,3	2,5	17,2	0,97
YAM ¹	144	0,6		20,2	1,0	5,3	34,7	18,6	19,7	1,31
	192			24,4	1,2	7,6	40,3	16,6	9,65	1,03
ΠYAM ²	96			17,3	0,62	5,6	51,2	12,8	12,5	1,14

¹YAM=Υδρόλυμα απόβλητου μπρόκολου,² ΠYAM=Προσομοίωση Υδρολύματος απόβλητου Μπρόκολου

Το μικροβιακό λίπος το οποίο παράχθηκε κατά τις ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας χρησιμοποιώντας τον ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* ATHUM

4411 στα υποστρώματα που αναφέρονται στον Πίνακα 3.6, αποτελούταν κυρίως από ελαϊκό οξύ με εύρος τιμών 37,28 - 58,12 %. Το λιπαρό οξύ το οποίο ακολουθεί σε ποσοστό είναι το παλμιτικό οξύ το οποίο δεν παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών πηγών άνθρακα (15,33-24,38 %). Όσον αφορά στην περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπους σε λινελαϊκό οξύ και γ -λινολενικό οξύ παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές, με τα ποσοστά να κυμαίνονται μεταξύ 11,68 - 19,67 %.

Πιο αναλυτικά, στο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα η γλυκόζη παρατηρείται κατά την έναρξη της μικροβιακής ζύμωσης το μέγιστο ποσοστό GLA ($^{16,9,12}\text{C}18:3$) (18,3 %) το οποίο μειώνεται στη συνέχεια, φτάνοντας το 12,23 %. Ακόμη, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την εμπορική ξυλόζη, το μεγαλύτερο ποσοστό GLA (15,67 %) παρατηρήθηκε στο τέλος της ζύμωσης (168 h). Η γαλακτόζη και η μαννόζη παρουσίασαν την μέγιστη περιεκτικότητά στο συγκεκριμένο λιπαρό οξύ σε χρόνο 120 h, με ποσοστά 18,32 % και 19,67 %, αντίστοιχα.

Ο βαθμός ακορεστότητας (UI) μεταξύ των μικροβιακών ζυμώσεων δεν παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις τιμών (1,51-0,97) καθώς τα κύρια λιπαρά οξέα όπως ελαϊκό, λινελαϊκό οξύ και το γ -λινολενικό οξύ δεν παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή.

3.3.9 Σύγκριση με τη βιβλιογραφία

Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.7) εμφανίζονται συγκριτικά αποτελέσματα παραγωγής βιομάζας, λιποπεριεκτικότητας και γ -λινολενικού οξέος (GLA) από το στέλεχος *Cunninghamella* και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 3.7 Στελέχη και υποστρώματα προς παραγωγή λιπαρών οξέων πλούσιων σε γ-λινολενικό οξύ από την παρούσα μελέτη και την βιβλιογραφία

Γένος	Υπόστρωμα	Συγκέντρωση βιομάζας	Συγκέντρωση Λιπιδίων(%w/w)	GLA(% w/w)	Πηγές
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATHUM 4411	Γλυκόζη	9,1(108 h)	39,6	14,8	Παρούσα Μελέτη
	Ξυλόζη	6,95(168 h)	36,5	15,5	
	Γαλακτόζη	10,07 (144 h)	38,5	12,0	
	Μαννόζη	10,48(84 h)	37,9	15,2	
	Αραβινόζη	0,26 (240 h)	20,5	17,2	
	Υ.Α.Μ ²	11,598(192 h)	14,0	19,6	Gema et al., 2002
	Π.Υ.Α.Μ ³	10,5 (96 h)	32,6	12,5	
	Γλυκόζη	6,7 (217 h)	44,7	11,4	Papanikolaou et al., 2007
	Άμυλο	13,5	28	14,2	
	Εμπορική γλυκόζη	12,9(309 h)	30	19,5	Chatzifragkou et al., 2010
	Εμπορική φρουκτόζη	16,7(405 h)	21	12,5	
	Εμπορική σακχαρόζη	19,6(376 h)	18	14,2	
	Μολάσσεες	12,1(356 h)	32	11,3	Bellou et al., 2012
	Καθαρή γλυκερόλη	6,9 (216 h)	25,1	15,3	
	Υδρόλυμα Τομάτας	17,6 (240-280 h)	39,6	11,5	Fakas et al., 2008
Γλυκόζη	9,4	47	15,9	Papanikolaou et al., 2004	
Ξυλόζη	5,8(360 h)	53,6	16,7	Fakas et al., 2009	
Γλυκόζη	15	46	14,7		
<i>Cunninghamella echinulata</i> CCRC31840	Διαλυτό Άμυλο	26,1(240 h)	29,3	11,2	Chen and Liu, 1997
	Διαλυτό άμυλο	29,8 (120 h)	26,9	12	Chen and Chang 1996
<i>Cunninghamella bainieri</i> 2A1	Γλυκόζη, 1.14 vvm, 400 rpm	12,1	39,3	29,4	Saad et al., 2014
<i>Cunninghamella elegans</i> CFRC07	Γλυκόζη	20,5 (96 h)		882 ¹	Varma et al., 2018
	Γλυκόζη(31 ζυμωτήρας), 500 rpm, 1 vvm			733 ¹	Varma et al., 2018
<i>Mutant-29 of Cunninghamella echinulata</i>	Γλυκόζη	6,6 (7 days)	34,7	15,7	Al-Hawash et al., 2018

¹mg/L, ²ΥΑΜ=Υδρόλυμα απόβλητου μπρόκολου, ³ΠΥΑΜ=Προσομοίωση Υδρολύματος απόβλητου Μπρόκολου

Σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές, η καλλιέργεια διαφορετικών στελεχών ζυγομυκήτων σε πηγές άνθρακα με βιοχημικές ομοιότητες (π.χ. γλυκόζη, άμυλο) μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετική συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους [Chatzifragkou et al., 2010]. Οι συνθήκες καλλιέργειας στο μακρο- και μικροπεριβάλλον της μικροβιακής ζύμωσης, το υπόστρωμα και το στέλεχος είναι οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τόσο την παραγωγή βιομάζας όσο και την συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους.

Από τα δεδομένα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7, η μέγιστη κυτταρική αύξηση (29,8 g/L) παρατηρείται μέσω της καλλιέργειας του στελέχους *Cunninghamella echinulata* CCRC31840 σε υπόστρωμα διαλυτού αμύλου [Chen and Chang, 1996]. Το στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 εμφανίζει τις μέγιστες συγκεντρώσεις βιομάζας σε υπόστρωμα σακχαρόζης (19,6 g/L), [Chatzifragkou et al., 2010], και υδρολύματος τομάτας (17,6 g/L) [Fakas et al., 2008]. Σύμφωνα με την καλλιέργεια του συγκεκριμένου στελέχους σε υποστρώματα ξυλόζης και γλυκόζης σημειώθηκε παραγωγή βιομάζας 6,95 g/L και 9,40 g/L αντίστοιχα, συγκεντρώσεις οι οποίες είναι όμοιες με τις συγκεντρώσεις της παρούσας μελέτης.

Όσον αφορά στη λιποπεριεκτικότητα, το στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 παρουσίασε υψηλά ποσοστά σε όλα τα υποστρώματα με τα υψηλότερα ποσοστά να παρατηρούνται στα υποστρώματα γλυκόζης 44,70 % w/w [Gema et al., 2002] και ξυλόζης 53,60 % w/w [Fakas et al., 2009], ενώ το χαμηλότερο παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα σακχαρόζης (18 %) σύμφωνα τη μελέτη Chatzifragkou et al., 2010. Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό λίπους επί ξηρής βιομάζας σε υπόστρωμα ξυλόζης εμφανίζει χαμηλότερο ποσοστό συγκριτικά με τις τιμές της βιβλιογραφίας, ενώ της γλυκόζης παρουσιάζει παρόμοιες τιμές. Παρόλα αυτά παρατηρείται ότι η καλλιέργεια του συγκεκριμένου στελέχους σε όλα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν εμφανίζει υψηλά ποσοστά, με μόνη εξαίρεση το υδρόλυμα από το απόβλητο μπρόκολου, το ποσοστό του οποίου ανέρχεται μόλις στο 13,96 % w/w.

Τέλος, συγκρίνοντας τη σύσταση των λιπιδίων σε γ -λινολενικό οξύ, με μόνη εξαίρεση τη μελέτη Saad et al., 2014 (29,4 %), δεν παρατηρείται μεγάλη διακύμανση τιμών με τα ποσοστά να κυμαίνονται μεταξύ 11,2-19,5 %. Τα χαμηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν σε υπόστρωμα διαλυτού αμύλου 11,2 % και 12 % με το μικροοργανισμό *Cunninghamella echinulata* CCRC31840. Η μεγαλύτερη

περιεκτικότητα σε GLA επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα γλυκόζης από το στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 (19,5 %) σύμφωνα με Chatzifragkou et al., 2010, ποσοστό το οποίο είναι υψηλότερο από την αντίστοιχη καλλιέργεια που διεξήχθη σε υπόστρωμα γλυκόζης στην παρούσα μελέτη. Τα ποσοστά σε γ -λινολενικό οξύ που επιτεύχθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη παρουσίασαν τιμές ικανοποιητικές όμοιες με της βιβλιογραφίας, με το υπόστρωμα της γαλακτόζης να παρουσιάζει τη χαμηλότερη περιεκτικότητα (11,98 %).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, όπου πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις στη σύσταση αποβλήτων του φυλλώδους μέρους του μπρόκολου, παρατηρήθηκε ότι αποτελούν σημαντική πηγή ολικής φαινολικής περιεκτικότητας, πρωτεϊνών και λιγνοκυτταρινούχων δομών. Το μεγαλύτερο ποσοστό σύστασής τους αποτελείται από την ημικυτταρίνη (39,86 %), ακολουθεί η κυτταρίνη (24,90 %) και η λιγνίνη (22,45 %). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να το καθιστά ιδανικό υπόστρωμα για μικροβιακές ζυμώσεις εφόσον πρώτα υδρολυθεί για την παραγωγή μονοσακχαριτών. Πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση με χρήση ημικυτταρινάσης και του ενζύμου viscozyme, δίνοντας το βέλτιστο αποτέλεσμα ως προς την υδρόλυση της κυτταρίνης (γλυκόζη 23,56 %), ενώ αντίθετα της ημικυτταρίνης έφτασε μόλις το 16,48 %. Παρόλα αυτά, η συγκέντρωση (30 g/L) των σακχάρων (γλυκόζη, σακχαρόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη) του υδρολύματος ήταν επαρκής ώστε να πραγματοποιηθεί ζύμωση κλειστής καλλιέργειας με το στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ζύμωση με αναλογία σακχάρων αντίστοιχης με αυτή του υδρολύματος, χρησιμοποιώντας εμπορικά σάκχαρα ως πηγές άνθρακα. Αυτό όμως που διαπιστώθηκε ήταν, ότι τόσο στο χρόνο κατανάλωσης του υποστρώματος όσο και στην συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις 2 ζυμώσεις. Στο υδρόλυμα του απόβλητου λαχανικού η λιποπεριεκτικότητα ανερχόταν στο 14,00 %, ενώ στη ζύμωση με τα συνθετικά σάκχαρα, το μέγιστο ποσοστό ισούταν με 32,60 %.

Συνοψίζοντας, καταλήγουμε σε δυο συμπεράσματα. Πρώτον ότι το συγκεκριμένο απόβλητο μπορεί να αξιοποιηθεί για την εκχύλιση ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας (αντιοξειδωτικά, πρωτεΐνες). Δεύτερον με τη βελτιστοποίηση της σύστασης του υδρολύματος του, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως υπόστρωμα σε μικροβιακές ζυμώσεις προς την παραγωγή λιπιδίων, πλούσιων σε λιπαρά οξέα (GLA) υψηλού κόστους, που δεν μπορούν να συντεθούν στον ανθρώπινο οργανισμό. Επομένως, η αξιοποίηση απόβλητων λαχανικών, που η ποσότητά τους αγγίζει ένα πολύ μεγάλο ποσοστό ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα, είναι ουσιαστικής σημασίας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aires, A., Rosa, E. and Carvalho, R. (2006). Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var.italica). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(10), 1512-1516.
- Al-Hawash, A. B., Li, S., Zhang, X., Zhang, X., & Ma, F. (2018). Productivity of γ -Linoleic acid by oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata* using a pulsed high magnetic field. *Food Bioscience*, 21, 1-7.
- Alpuche-Solis, A. G., & Paredes-Lopez, Octavio. (1992). Assessment of glucosinolates in broccoli by three different methodologies. *Journal of food biochemistry*, 16(5), 265-275.
- Ares, A., Nozal, M. and Bernal, J. (2013). Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. *Journal of Chromatography A*, 1313, 78-95.
- Babik, I. and Elkner, K. (2002). The effect of Nitrogen fertilization and irrigation on yield and quality of broccoli. *Acta Horticulturae*, (571), 33-43.
- Bellou, S., Triantaphyllidou, I., Aggeli, D., Elazzazy, A., Baeshen, M. and 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.
- Bhandari, S. and Kwak, J. (2015). Chemical Composition and Antioxidant Activity in Different Tissues of Brassica Vegetables. *Molecules*, 20(1), 1228-1243.
- Bisaria, V. and Ghose, T. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, 3(2), 90-104.
- Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E. and Caboni, M. (2004). Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare*L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5195-5200.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

- Büchert, A., Gómez Lobato, M., Villarreal, N., Civello, P. and Martínez, G. (2010). Effect of visible light treatments on postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(2), 355-361.
- Campas-Baypoli, O., Sánchez-Machado, D., Bueno-Solano, C., Núñez-Gastélum, J., Reyes-Moreno, C. and López-Cervantes, J. (2009). Biochemical composition and physicochemical properties of broccoli flours. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup4), 163-173.
- Certik, M. and Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1), 1-14.
- Certik, M., Megova, J. and Horenitzky, R. (1999). Effect of nitrogen sources on the activities of lipogenic enzymes in oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45(6), 289-293.
- Chandel, A. K., Antunes, F. A., De Arruda, P. V., Milessi, T. S., Da Silva, S. S., & de Almeida Felipe, M. D. G. (2012). Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: state-of-the-art. In *d-xylitol* (39-61). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Chatzifragkou, A., Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G. and Papanikolaou, S. (2010). Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9), 1048-1057.
- Chen, H. and Chang, C. (1996). Production of γ -Linolenic Acid by the Fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnology Progress*, 12(3), 338-341.
- Chen, H. and Liu, T. (1997). Inoculum effects on the production of γ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(2), 137-142.
- Chen, P. S., Toribara, T. T., & Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Analytical chemistry*, 28(11), 1756-1758.
- Das, H. and Singh, S. (2004). Useful Byproducts from Cellulosic Wastes of Agriculture and Food Industry—A Critical Appraisal. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(2), 77-89.
- De Laurentiis, V., Corrado, S. and Sala, S. (2018). Quantifying household waste of fresh fruit and vegetables in the EU. *Waste Management*, 77, 238-251.

- Dél ris, I. and Wallecan, J. (2017). Relationship between processing history and functionality recovery after rehydration of dried cellulose-based suspensions: A critical review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 246, 1-12.
- dos Reis, L., de Oliveira, V., Hagen, M., Jablonski, A., Fl res, S. and de Oliveira Rios, A. (2015). Carotenoids, flavonoids, chlorophylls, phenolic compounds and antioxidant activity in fresh and cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. Alphina F1). *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 177-183.
- Evans, C. and Ratledge, C. (1984). Induction of xylulose-5-phosphate phosphoketolase in a variety of yeasts grown on D-xylose: the key to efficient xylose metabolism. *Archives of Microbiology*, 139(1), 48-52.
- Fakas, S.,  ertik, M., Papanikolaou, S., Aggelis, G., Komaitis, M. and Galiotou-Panayotou, M. (2008). γ -Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 99(13), 5986-5990.
- Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Papanikolaou, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2007). Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1321-1327.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchos, A. and Aggelis, G. (2009). Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy*, 33(4), 573-580.
- FAO. <http://www.fao.org/save-food/resources/keyfindings/infographics/fruit/en/> (visited on 1/10/2018)
- FAOSTAT Forestry statistics. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (visited on 25/09/2018)
- Faustino, H., Gil, N., Baptista, C. and Duarte, A. (2010). Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds Extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors. *Molecules*, 15(12), 9308-9322.
- Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J., Saraiva, J. and Ramalhosa, E. (2017). Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 38-50.

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.

From the Sugar Platform to biofuels and biochemicals : Final report for the European Commission Directorate-General Energy. (2015). E4tech/RECORD/Wageningen UR.

Gawlik-Dziki, U. (2008). Effect of hydrothermal treatment on the antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. *Food Chemistry*, 109(2), 393-401.

Gema, A. Kavadia, D. Dimou, V. Tsag, H. (2002). Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 303-307.

Gu, Y., Guo, Q., Zhang, L., Chen, Z., Han, Y. and Gu, Z. (2011). Physiological and Biochemical Metabolism of Germinating Broccoli Seeds and Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 209-213.

Gunathilake, K. and Ranaweera, K. (2016). Antioxidative properties of 34 green leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, 26, 176-186.

Gustafsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., & Emanuelsson, A. (2013). *The methodology of the FAO study: Global Food Losses and Food Waste—extent, causes and prevention*—FAO, 2011. SIK Institutet för livsmedel och bioteknik.

Hasperué, J., Chaves, A. and Martínez, G. (2011). End of day harvest delays postharvest senescence of broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 59(1), 64-70.

Houben, K., Jolie, R., Fraeye, I., Van Loey, A. and Hendrickx, M. (2011). Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, 346(9), 1105-1111.

i Canals, L. M., Muñoz, I., Hospido, A., Plassmann, K., McLaren, S., Edwards-Jones, G., & Hounsome, B. (2008). Life Cycle Assessment (LCA) of domestic vs. imported vegetables. Case studies on broccoli, salad crops and green beans. *United Kingdom, Cent. Environ. Strateg. Univ. Surrey*, 46.

- Jeffery, E., Brown, A., Kurilich, A., Keck, A., Matusheski, N., Klein, B. and Juvik, J. (2003). Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(3), 323-330.
- Kamm, B., Kamm, M. and Gruber, P. (2006). *Biorefineries - industrial processes and products*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Kamm, M., Kamm, B. and Gruber, P. (2010). *Biorefineries - industrial processes and products*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kates, M., & Baxter, R. (1962). Lipid composition of mesophilic and psychrophilic yeasts (*Candida* species) as influenced by environmental temperature. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 40(9), 1213-1227.
- Koutinas A., Chatzifragkou A., Kopsahelis N., Papanikolaou S., Kookos I.K. (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, 116, 566-577.
- Koutinas, A., Wang, R. and Webb, C. (2007). The biochemurgist –Bioconversion of agricultural raw materials for chemical production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(1), 24-38.
- Lagarde, P., Przybyl, J., Brulard, C., Pérot, G., Pierron, G., Delattre, O., Sciot, R., Wozniak, A., Schöffski, P., Terrier, P., Neuville, A., Coindre, J., Italiano, A., Orbach, D., Debiec-Rychter, M. and Chibon, F. (2013). Chromosome Instability Accounts for Reverse Metastatic Outcomes of Pediatric and Adult Synovial Sarcomas. *Journal of Clinical Oncology*, 31(5), 608-615.
- Lie, S. (1973). The ebc-ninhydrin method for determination of free amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37-41.
- Martins, N. and Ferreira, I. (2017). Wastes and by-products: Upcoming sources of carotenoids for biotechnological purposes and health-related applications. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 33-48.
- Matejić, J., Džamić, A., Mihajilov-Krstev, T., Ranđelović, V., Krivošej, Z. and Marin, P. (2012). Total phenolic content, flavonoid concentration, antioxidant and antimicrobial activity of methanol extracts from three *Seseli* L. taxa. *Open Life Sciences*, 7(6).
- Matthee, V., & Appledorf, H. (1978). Effect of cooking on vegetable fiber. *Journal of Food Science*, 43(4), 1344-1345.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.

Moreno, D., Carvajal, M., López-Berenguer, C. and García-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1508-1522.

Mukherjee, S., Das, P. and Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 509-515.

Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L. and Syldatk, C. (2016). Production Strategies and Applications of Microbial Single Cell Oils. *Frontiers in Microbiology*, 7.

Pacht, E., DeMichele, S., Nelson, J., Hart, J., Wennberg, A. and Gadek, J. (2003). Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, γ -linolenic acid, and antioxidants reduces alveolar inflammatory mediators and protein influx in patients with acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine*, 31(2), 491-500.

Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource technology*, 74(1), 17-24.

Panda, S. K., Mishra, S. S., Kayitesi, E., & Ray, R. C. (2016). Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. *Environmental research*, 146, 161-172.

Papanikolaou, S., Sarantou, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2004). Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), 867-875.

Pontes-Arruda, A., Aragão, A. and Albuquerque, J. (2006). Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, γ -linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock*. *Critical Care Medicine*, 34(9), 2325-2333.

Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.

Rosa, E., David, M. and Gomes, M. (2001). Glucose, fructose and sucrose content in broccoli, white cabbage and Portuguese cabbage grown in early and late seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(12), 1145-1149.

Saad, N., Abdesahian, P., Kalil, M. S., Wan Yusoff, W. M., & Abdul Hamid, A. (2014). Optimization of aeration and agitation rate for lipid and gamma linolenic acid production by *Cunninghamella bainieri* 2A1 in submerged fermentation using response surface methodology. *The Scientific World Journal*, 2014.

- Sergeant, S., Rahbar, E. and Chilton, F. (2016). Gamma-linolenic acid, Dihomo-gamma linolenic, Eicosanoids and Inflammatory Processes. *European Journal of Pharmacology*, 785, 77-86.
- Sorensen, J. (1999). Nitrogen effects on vegetable crop production and chemical composition. *Acta Horticulturae*, (506), 41-50.
- Taylor, R., Natrass, L., Alberts, G., Robson, P., Chudziak, C., Bauen, A., ... & Chiaramonti, D. (2015). *From the sugar platform to biofuels and biochemicals: final report for the European Commission Directorate-General Energy*. E4tech/RECORD/Wageningen UR.
- Terry, L. A., Mena, C., Williams, A., Jenney, N., & Whitehead, P. (2011). Fruit and vegetable resource maps: Mapping fruit and vegetable waste through the retail and wholesale supply chain. *WRAP, RC008*.
- Tsakona, S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Kookos, I. and Koutinas, A. (2014). Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Biotechnology*, 189, 36-45.
- Vasanthi, H. R., Mukherjee, S., & Das, D. K. (2009). Potential health benefits of broccoli-a chemico-biological overview. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 9(6), 749-759.
- Ventour, L. (2008). Food waste report v2, in the food we waste. Exodus Market Research.
- Winkelhausen, E. and Kuzmanova, S. (1998). Microbial conversion of d-xylose to xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(1), 1-14.
- WRAP, W. (2009). Household food and drink waste in the UK. Report prepared by WRAP. Banbury, UK.
- Wyman, C. E., Decker, S. R., Himmel, M. E., Brady, J. W., Skopec, C. E., & Viikari, L. (2005). Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*, 1, 1023-1062.
- Xu, W., Xie, W., Huang, X., Chen, X., Huang, N., Wang, X. and Liu, J. (2017). The graphene oxide and chitosan biopolymer loads TiO₂ for antibacterial and preservative research. *Food Chemistry*, 221, 267-277.
- Ye, N., Lü, F., Shao, L., Godon, J. and He, P. (2007). Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1055-1065.

Yildirim, E., Guvenc, I., Turan, M., & Karatas, A. (2007). Effect of foliar urea application on quality, growth, mineral uptake and yield of broccoli (*Brassica oleracea* L., var. *italica*). *Plant Soil and Environment*, 53(3), 120.