

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων

ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

Κατεύθυνση: Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων



Μεταπτυχιακή διατριβή

«Ανάπτυξη θρεπτικού μέσου για την βιοτεχνολογική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με χρήση του οργανικού κλάσματος από αστικά στερεά απόβλητα.»

ΧΡΙΣΤΙΝΑ Π. ΔΑΜΑΛΑ

Επιβλέπων καθηγητής:

Κουτίνας Αποστόλης

Αθήνα, Ιανουάριος 2020

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων

ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

Κατεύθυνση: Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων

Μεταπτυχιακή διατριβή

«Ανάπτυξη θρεπτικού μέσου για την βιοτεχνολογική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με χρήση του οργανικού κλάσματος από αστικά στερεά απόβλητα»

«Development of nutrient medium for biotechnological production of succinic acid using organic fraction of municipal solid waste»

Εξεταστική επιτροπή:

Κουτίνας Αποστόλης

Παπανικολάου Σεραφείμ

Στοφόρος Νικόλαος

Επιβλέπων καθηγητής:

Κουτίνας Αποστόλης

ΧΡΙΣΤΙΝΑ Π. ΔΑΜΑΛΑ

Αθήνα, Ιανουάριος 2020

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο “Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων” του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ», με κατεύθυνση ‘Συντήρηση και επεξεργασία τροφίμων’.

Με σκοπό την συγγραφή αυτής της μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της έρευνας.

Συγκεκριμένα, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή, κύριο Κουτίνα Αποστόλη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για την επιστημονική του καθοδήγηση.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα, κα Στυλιανού Ελένη, για τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχε πάνω στο θέμα της παραγωγής του επιθυμητού προϊόντος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων, για την συνεχή προσπάθεια στην μετάδοση των πρακτικών χειρισμών σχετικά με τον χειρισμό των μικροοργανισμών, καθώς και για την καθοδήγησή της με στόχο την ολοκλήρωση της ερευνητικής μελέτης.

Στην συνέχεια, ευχαριστώ θερμά την κα Πατεράκη Χρυσάνθη τόσο για τις γνώσεις που μου μετέδωσε κατά την διάρκεια της ερευνητικής μελέτης, όσο και για την πολύτιμη βοήθεια της όποτε την χρειάστηκα.

Ευχαριστώ επίσης όλους τους υποψήφιους διδάκτορες, κα Φιλίππη Κατιάνα, κα Ευθυμίου Νεφέλη - Μαρία, κα Ψάκη Όλγα, κα Μάινα Σοφία, κα Τσούκο Ερμίντα, κ. Λαδάκη Δημήτρη, κ. Παπαποστόλου Χαρίλαο, καθώς και τους υποψήφιους μεταπτυχιακούς φοιτητές, κ. Χαλμούκο Γρηγόρη, κα Κόπανου Ελίνα και κα Ιωαννίδου Σοφία για τις γνώσεις που παρείχε ο καθένας και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε κατά την διάρκεια των πειραματικών διεργασιών.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου, Πέτρο και Ελένη, για την συνεισφορά τους και τη κατανόησή τους, καθώς και στις αδερφές μου Κωσταντίνα Σωτηρία, στον Νίκο και στους φίλους μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εξετάστηκε η αξιοποίηση του οργανικού κλάσματος αστικών στερεών αποβλήτων για τη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και ανάπτυξη του μικροοργανισμού μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με τη χρήση του γενετικά τροποποιημένου στελέχους *Yarrowia lipolytica* PSA02004.

Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα στην παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος και ανάπτυξη του μικροοργανισμού με τη χρήση μίγματος εμπορικών σακχάρων σε συνθετικό υπόστρωμα, ίδιας σύστασης με αυτή του υδρόλυματος αστικών αποβλήτων. Παράλληλα όμως μελετήθηκε και η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα χρησιμοποιώντας το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, με τη συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος να είναι ίση με 30,56 g/L έναντι 22,2 g/L, που είχαν παραχθεί στο συνθετικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 70 g/L και στις δύο περιπτώσεις. Επίσης παρατηρήθηκε ότι χρησιμοποιώντας το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων η τελική ποσότητα οξικού οξέος είναι μικρότερη από 1 g/L σε όλες τις περιπτώσεις.

Τέλος, αξιολογήθηκε η αξιοποίηση του οξικού οξέος ως πιθανή εναλλακτική πηγή άνθρακα για τη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος σε ασυνεχείς και ημι-συνεχείς ζυμώσεις με προσθήκη ή χωρίς προσθήκη οξικού οξέος στην αρχή της ζύμωσης ή και στη διάρκεια ως τροφοδοσία. Ωστόσο, με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι το οξικό δεν καταναλώνεται από τον μικροοργανισμό ως η μοναδική πηγή άνθρακα. Αντίθετα η χρήση του οξικού οξέος ως τροφοδοσία σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις καταναλωνόταν από το μικροοργανισμό.

Λέξεις κλειδιά: ηλεκτρικό οξύ, υδρόλυμα αστικών αποβλήτων, *Yarrowia lipolytica*, ασυνεχείς ζυμώσεις, ημι-συνεχείς ζυμώσεις

ABSTRACT

In the present study the utilisation of organic fractions of municipal solid waste (OFMSW) as feedstock for succinic acid production and microbial growth was examined through fermentations using the genetically modified yeast strain *Yarrowia lipolytica* PSA02004.

In the first stage, the effect of initial sugar concentration was evaluated in both synthetic media with commercial carbon source and OFMSW hydrolysate in batch fermentations. The synthetic medium containing commercial carbon sources in similar ratio as the one contained in OFMSW hydrolysate. The fermentation efficiency was improved using OFMSW hydrolysate as the final succinic acid concentration increased compared to the commercial substrates. Specifically, succinic acid concentration was 30,56 g/L against to 22,2 g/L which was produced using the synthetic medium with an initial sugar concentration 70 g/L in both cases. Also, it was observed that using OFMSW hydrolysate the final acetic acid concentration was less than 1 g/L in all of the cases.

Finally, the utilisation of acetic acid as an alternative carbon source for the production of succinic acid in batch and fed-batch fermentations was performed with or without addition of acetic acid at the beginning of fermentation. Based on the experimental results, acetic acid was not consumed by the microorganism as the sole carbon source. However, using concentrate acetic acid as feeding solution in fed-batch fermentations was effectively consumed.

Keywords: succinic acid, municipal solid waste hydrolysate, *Yarrowia lipolytica*, batch fermentations, fed-batch fermentations

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	v
ABSTRACT.....	vi
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	xiii
1 Εισαγωγή.....	14
1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ηλεκτρικού οξέος.....	14
1.2 Παγκόσμια αγορά και βιομηχανικές εφαρμογές ηλεκτρικού οξέος.....	15
1.3 Παραγωγοί ηλεκτρικού οξέος μέσω της βιοτεχνολογικής οδού.....	16
1.3.1 <i>Yarrowia lipolytica</i> PSA02004.....	17
1.4 Πρώτες ύλες.....	20
1.4.1 Αστικά στερεά απόβλητα.....	20
1.5 Σκοπός της μελέτης.....	23
2 Μεθοδολογία έρευνας.....	24
2.1 Βιολογικό υλικό.....	24
2.2 Προετοιμασία υγρού εμβολίου.....	24
2.3 Προ-επεξεργασία υδρολύματος αστικών αποβλήτων και προσδιορισμός της σύστασης του.....	25
2.4 Μελέτη επίδρασης αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα.....	25
2.4.1 Χρήση εμπορικών σακχάρων σε συνθετικό υπόστρωμα ως πηγή άνθρακα.....	25
2.4.2 Χρήση υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου.....	26
2.5 Μελέτη κατανάλωσης οξικού οξέος με χρήση γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα.....	26
2.5.1 Ασυνεχείς ζυμώσεις.....	26
2.5.2 Ημι-συνεχείς ζυμώσεις.....	27

2.6	Μέθοδοι ανάλυσης.....	28
2.6.1	Προσδιορισμός σακχάρων και δευτερογενών μεταβολιτών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	28
2.6.2	Προσδιορισμός βιομάζας.....	28
2.6.3	Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (Free Amino Nitrogen, FAN) 29	
2.6.4	Προσδιορισμός του ανόργανου φωσφόρου (Inorganic Phosphorus Analysis, IP) 31	
3	Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	33
3.1	Σύσταση υδρολύματος αστικών αποβλήτων.....	33
3.2	Μελέτη επίδραση αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα.....	34
3.2.1	Χρήση εμπορικών σακχάρων σε συνθετικό υπόστρωμα ως πηγή άνθρακα	34
3.2.2	Χρήση υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου	41
3.3	Μελέτη κατανάλωσης οξικού οξέος.....	48
3.3.1	Ασυνεχείς ζυμώσεις.....	48
3.3.2	Ημι-συνεχείς ζυμώσεις.....	52
4	Συζήτηση.....	57
5	Βιβλιογραφία.....	61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σύσταση αντιδραστηρίων για την μέτρηση FAN.....	31
Πίνακας 2: Σύσταση υδρολύματος αστικών αποβλήτων.....	33
Πίνακας 3 Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα στη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος.....	48
Πίνακας 4 Βιοτεχνολογική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις.....	56
Πίνακας 5 Βιοτεχνολογική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.....	60

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1 Βιοτεχνολογικά παραγόμενο ηλεκτρικό οξύ σύμφωνα με τις εφαρμογές του, 2012-2020 (Πηγή: www.grandviewresearch.com).....	16
Διάγραμμα 2: Αστικά στερεά απόβλητα που παράγονται ανά κάτοικο στη ΕΕ το 2004 και 2012.....	22
Διάγραμμα 3 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της ποσότητας FAN σε mg/L.	30
Διάγραμμα 4 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της ποσότητας IP σε mg/L.	32
Διάγραμμα 5 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (\blacktriangle), οξικό οξύ (\bullet), ξηρή βιομάζα ($-\blacktriangle-$) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (\diamond) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L.....	34
Διάγραμμα 6 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (\blacktriangle), οξικό οξύ (\bullet), ξηρή βιομάζα ($-\blacktriangle-$) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (\diamond) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 50 g/L.....	35
Διάγραμμα 7 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (\blacktriangle), οξικό οξύ (\bullet), ξηρή βιομάζα ($-\blacktriangle-$) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (\diamond) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 70 g/L.....	36
Διάγραμμα 8 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (\blacktriangle), οξικό οξύ (\bullet), ξηρή βιομάζα ($-\blacktriangle-$) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (\diamond) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 100 g/L.....	37
Διάγραμμα 9 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (\blacktriangle), οξικό οξύ (\bullet), ξηρή βιομάζα ($-\blacktriangle-$) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (\diamond) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 150 g/L.....	38
Διάγραμμα 10 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (\blacktriangle), οξικό οξύ (\bullet), ξηρή βιομάζα ($-\blacktriangle-$) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (\diamond) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 200 g/L.....	39

Διάγραμμα 11 Ηλεκτρικό οξύ (g/L) (■), Οξικό οξύ (g/L) (■) και βιομάζα g/L (□) με τη χρήση εμπορικών σακχάρων σε συνθετικό υπόστρωμα σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων.....	40
Διάγραμμα 12 Συντελεστής απόδοσης g/g (□) και παραγωγικότητα g/L/h (■) με τη χρήση εμπορικών σακχάρων σε συνθετικό υπόστρωμα σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων.....	41
Διάγραμμα 13 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (▲), Οξικό οξύ (●), Γαλακτικό οξύ (□) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (◇) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση υδρολύματος 50 g/L.....	42
Διάγραμμα 14 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (▲), οξικό οξύ (●), Γαλακτικό οξύ (□) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (◇) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση υδρολύματος 70 g/L.....	43
Διάγραμμα 15 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (▲), οξικό οξύ (●), Γαλακτικό οξύ (□) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (◇) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση υδρολύματος 100 g/L.....	44
Διάγραμμα 16 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (▲), οξικό οξύ (●), Γαλακτικό οξύ (□) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (◇) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση υδρολύματος 200 g/L.....	45
Διάγραμμα 17 Ηλεκτρικό οξύ (g/L) (■) και Οξικό οξύ (g/L) (■) με τη χρήση υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων.....	46
Διάγραμμα 18 Συντελεστής απόδοσης g/g (□) και παραγωγικότητα g/L/h (■) με τη χρήση υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων.....	46
Διάγραμμα 19 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), γλυκερόλη (▲), οξικό οξύ (●), και ξηρή βιομάζα (-▲-) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης.....	50
Διάγραμμα 20 Ηλεκτρικό οξύ (g/L) (■), Οξικό οξύ (g/L) (■) και βιομάζα g/L (≤) σε ασυνεχείς ζυμώσεις μελέτης κατανάλωσης οξικού οξέος.....	51
Διάγραμμα 21 Συντελεστής απόδοσης g/g (■) και παραγωγικότητα g/L/h (≤) σε ασυνεχείς ζυμώσεις μελέτης κατανάλωσης οξικού οξέος.....	51

Διάγραμμα 22 Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Δ), βιομάζας (-▲-), οξικού οξέος (●) και κατανάλωση γλυκερόλης (▲) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με γλυκερόλη χωρίς αρχική προσθήκη οξικού οξέος.....	53
Διάγραμμα 23 Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Δ), βιομάζας (-▲-), οξικού οξέος (●) και κατανάλωση γλυκερόλης (▲) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με γλυκερόλη με αρχική προσθήκη οξικού οξέος.....	53
Διάγραμμα 24 Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Δ), βιομάζας (-▲-), οξικού οξέος (●) και κατανάλωση σακχάρων (▲) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση χωρίς αρχική προσθήκη οξικού οξέος.....	55
Διάγραμμα 25 Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Δ), βιομάζας (-▲-), οξικού οξέος (●) και κατανάλωση σακχάρων (▲) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με αρχική προσθήκη οξικού οξέος	55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής ηλεκτρικού οξέος από το στέλεχος <i>Yarrowia lipolytica</i> (Yang et al., 2017).....	19
Εικόνα 2 Στέλεχος <i>Yarrowia lipolytica</i> PSA02004.....	24
Εικόνα 3 Η αντίδραση που πραγματοποιείται κατά τη μέθοδο προσδιορισμού FAN....	29

1 Εισαγωγή

Η συνεχόμενη κατανάλωση των ορυκτών καυσίμων έχει οδηγήσει στην σταδιακή μείωσή τους, και συνεπώς στην αύξηση της τιμής τους. Μέχρι και σήμερα, η παραγωγή πολλών χημικών ενώσεων γίνεται αποκλειστικά μέσω των κλασσικών χημικών μεθόδων από μη ανανεώσιμες πηγές, κυρίως το πετρέλαιο. Οι οικονομικές και περιβαλλοντικές ανησυχίες ώθησε τον άνθρωπο σε εναλλακτικές λύσεις όπως η ανάπτυξη βιοδιωλιστηρίων που ενσωματώνουν διαδικασίες μετατροπής βιομάζας και παραγωγής καυσίμων, ενέργειας και βιοτεχνολογικών χημικών από ανανεώσιμες πηγές. Η αντικατάσταση των κλασσικών χημικών μεθόδων με βιοτεχνολογικές μεθόδους που βασίζονται αποκλειστικά στην αξιοποίηση της περίσσειας βιομάζας και αποβλήτων, θεωρείται μια καλή εναλλακτική λόγω του περιβαλλοντικού οφέλους (Willke and Vorlop, 2004, Ragauskas *et al.*, 2006).

Η βιοτεχνολογική παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος έχει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των πολλαπλών βιομηχανικών εφαρμογών του, όπως στις βιομηχανίες τροφίμων, χημικών και φαρμακευτικών προϊόντων και βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών. Πρόσφατα ωστόσο, η παραγωγή του από ανανεώσιμες πηγές άνθρακα αποτελεί μια οικονομική μέθοδο και έχει αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον (Kumar, Singh and Singh, 2008).

1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ηλεκτρικού οξέος

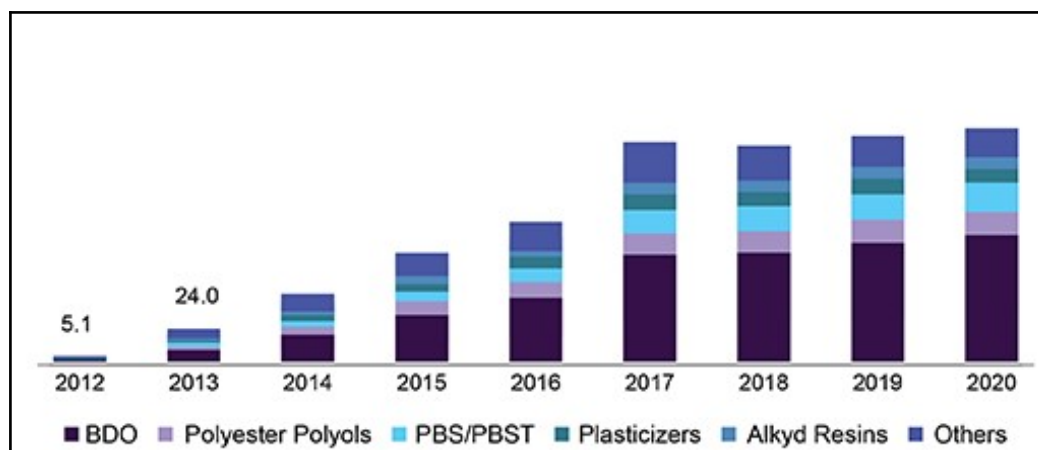
Το ηλεκτρικό οξύ γνωστό ως βουτανοδιϊκό οξύ (κατά IUPAC ονομασία) είναι ένα οργανικό δικαρβοξυλικό οξύ με τέσσερα άτομα άνθρακα και χημικό τύπο $C_4H_6O_4$. Είναι ένα άχρωμο υπό μορφή κρυστάλλων οξύ το οποίο είναι διαλυτό στο νερό, την αιθανόλη και την ακετόνη. Χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στα τρόφιμα με κωδικό E363, κυρίως ως βελτιωτικό γεύσης και ως ρυθμιστής οξύτητας. Αρχικά παρασκευάστηκε μέσω απόσταξης του κεχριμπαριού, λατινική ονομασία ήλεκτρο, το 1950 ως εκ τούτου και η ονομασία του. Σύμφωνα με το Υπουργείο Ενέργειας των ΗΠΑ (2004) θεωρείται ως μία από τις 12 βασικές δομικές χημικές ουσίες υψηλής προστιθέμενης αξίας με δυνατότητα παραγωγής του μέσω βιολογικών μετατροπών (Cheng K., Zhao X.B., Zeng J., 2012).

1.2 Παγκόσμια αγορά και βιομηχανικές εφαρμογές ηλεκτρικού οξέος

Η ετήσια παγκόσμια παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος το 2013 ήταν 38 χιλιάδες τόνοι το χρόνο με εκτίμηση της αύξησης του ρυθμού παραγωγής έως και 18% μέχρι το 2016. Η ετήσια αγορά του βιοτεχνολογικά παραγόμενου ηλεκτρικού οξέος εκτιμήθηκε στα 108 M\$ για το 2013, ενώ αντίστοιχα για το πετροχημικά παραγόμενο ηλεκτρικό οξύ στα 10M\$. Επιπρόσθετα, το κόστος του βιοτεχνολογικά παραγόμενου ηλεκτρικού οξέος είναι 2860 \$ ανά τόνο ηλεκτρικού οξέος σε αντίθεση με το πετροχημικά παραγόμενο ηλεκτρικό οξύ το οποίο έχει κόστος 2500 \$ ανά τόνο ηλεκτρικού οξέος. (Cao et al, 2013)

Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών, στοχεύει στην μείωση της τιμής του ηλεκτρικού οξέος στα 0,55 \$/kg με την ετήσια παραγωγή του να ανέρχεται πάνω από 75 kt/y. Αυτά τα οικονομικά δεδομένα ανοίγουν νέες προοπτικές στην αγορά του ηλεκτρικού οξέος (Zeikus et al, 1999).

Το ηλεκτρικό οξύ χρησιμοποιείται σε διάφορους τομείς και έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Χρησιμοποιείται ως επιφανειοδραστική ουσία και ως αφριστικός παράγοντας. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιείται ως μέσο οξύνισης (ρυθμιστής pH), ως βελτιωτικό γεύσης και με επιπλέον χαρακτηριστικό την αντιμικροβιακή του δράση. Αυξανόμενο πεδίο εφαρμογής σε λιπαντικά, χρωστικές ουσίες, προϊόντα προσωπικής φροντίδας και χρωστικές ουσίες τροφίμων. Επίσης, χρησιμοποιείται στην παραγωγή προϊόντων όπως φαρμακευτικά είδη, αντιβιοτικά, αμινοξέα, και βιταμίνες. Το βιοτεχνολογικά παραγόμενο ηλεκτρικό οξύ έχει τη δυνατότητα να αντικαταστήσει τα χημικά παραγόμενα προϊόντα προερχόμενα από το βενζόλιο, με αποτέλεσμα τη ταυτόχρονη μείωση της ρύπανσης που προκαλείται από την παραγωγή και κατανάλωση τους (Ahmed και Morris 1994). Λόγω της χημικής δομής του (γραμμικό κορεσμένο δικαρβοξυλικό οξύ), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ενδιάμεση χημική ουσία και να μετατραπεί σε 1,4-βουτανοδιόλη, τετραϋδροφουράνη, γ-βουτυρολακτόνη και σε πολλές άλλες χημικές ουσίες που αποτελούνται από τέσσερα άτομα άνθρακα των οποίων οι ποσότητες υπερβαίνουν τα 275×10^6 kg ετησίως (Zeikus et al, 1999). Η αύξηση της ζήτησης για τη μετατροπή του σε 1,4-βουτανοδιόλη και στα παράγωγά του είναι πιθανό να τονώσουν την ανάπτυξη της παραγωγής και αγοράς του ηλεκτρικού οξέος (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1 Βιοτεχνολογικά παραγόμενο ηλεκτρικό οξύ σύμφωνα με τις εφαρμογές του, 2012-2020 (Πηγή: www.grandviewresearch.com)

1.3 Παραγωγοί ηλεκτρικού οξέος μέσω της βιοτεχνολογικής οδού

Το ηλεκτρικό οξύ αποτελεί ένα ενδιάμεσο συστατικό της μεταβολικής οδού πολλών αναερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών. Παράγεται από τα βακτηριακά είδη *Propionibacterium*, σε τυπικά γαστρεντερικά βακτήρια όπως *Escherichia coli*, *Pectinatus sp.*, *Bacteroides sp.* και σε βακτήρια του προστομάχου όπως *Ruminococcus flavefaciens*, *Basfia succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Bacteroides samylophilus*, *Prevotellatum inicola*, *Succinimonas amylolytica*, *Succinivibrio dextrinisolvens*, *Wolinella succinogenes* και *Cytophaga succinicans* (Vander Werf et al 1997). Οι περισσότεροι από τους μικροοργανισμούς που παράγουν ηλεκτρικό οξύ έχουν απομονωθεί από τον πρώτο στόμαχο των μηρυκαστικών, στο οποίο λειτουργεί ως μία σημαντική πρόδρομη ουσία για τον σχηματισμό προπιονικού οξέος. Το προπιονικό οξύ απορροφάται μέσω των τοιχωμάτων του προστομάχου και στην συνέχεια οξειδώνεται παρέχοντας ενέργεια και πρόδρομα βιοσύνθετα μόρια στο ζώο. Επίσης, το ηλεκτρικό οξύ παράγεται από μικροοργανισμούς που απομονώνονται από το πεπτικό σύστημα άλλων ζώων. Για παράδειγμα, το κατά Gram αρνητικό, υποχρεωτικά αναερόβιο βακτήριο *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, έχει απομονωθεί από το στόμα του σκύλου Beagle και παράγει ηλεκτρικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ από γλυκόζη και λακτόζη (Davis et al., 1976). Οι μικροοργανισμοί *Basfia succiniciproducens* και *Actinobacillus succinogenes* είναι αναερόβια βακτήρια

που έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα όπως είναι η L-αραβινόζη, η κελλοβιόζη, η φρουκτόζη, η γαλακτόζη, η γλυκόζη, η λακτόζη, η μαλτόζη, η μαννιτόλη, η μαννόζη, η σακχαρόζη, η D-ξυλόζη και η σαλικυλίνη (Guettler et al., 1999). Τα βακτήρια αυτά παράγουν ηλεκτρικό οξύ στην μεγάλη κοιλία των ζώων σε υψηλές συγκεντρώσεις, μαζί με οξικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ, μυρμηκικό οξύ και αιθανόλη. Ακόμα, οι μικροοργανισμοί *Mannheimia succiniciproducens* και *Escherichia coli* χρησιμοποιούνται στη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος. Παρ' όλα αυτά, οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί παρεμποδίζονται από την υψηλή συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος (Lee et al., 2002, Sanchez et al., 2005).

1.3.1 *Yarrowia lipolytica* PSA02004

Η χρήση των γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών για τη βιοτεχνολογική παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας έχει αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον στις μέρες μας. Ο μικροοργανισμός *Yarrowia lipolytica* είναι ένας από αυτούς. Είναι ένας αυστηρά αερόβιος μικροοργανισμός και έχει τη δυνατότητα να καταναλώνει μεγάλο εύρος υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων γλυκόζης, γλυκερόλη, αιθανόλη, οξικό οξύ αλλά και υδρόφοβα υποστρώματα όπως λίπος και λιπαρά οξέα (Bankar et al., 2009). Επίσης σύμφωνα με μελέτες, το συγκεκριμένο στέλεχος *Y. lipolytica* PSA02004, έχει τη δυνατότητα να καταναλώνει ξυλόζη για τη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος λόγω της ενεργοποίησης της αφυδρογονάσης της ξυλιτόλης, παρ' όλα αυτά η ξυλόζη δεν μπορεί να καταναλωθεί ως η μοναδική πηγή άνθρακα. Στο παρών στέλεχος μεταβολίζεται αφού έχει σταθεροποιηθεί η ανάπτυξη της βιομάζας (Ong et al., 2019). Ωστόσο η ξυλόζη μεταβολίζεται ως κύρια πηγή άνθρακα από άλλους μικροοργανισμούς, κυρίως βακτήρια, προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Wang et al., 2011). Επίσης, η ζύμη *Y. lipolytica* παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε περιβαλλοντικά στρες όπως παρουσία αλατιού, χαμηλή θερμοκρασία, όξινες και αλκαλικές συνθήκες. Παράγει διάφορα οργανικά οξέα όπως κιτρικό οξύ, ισοκιτρικό οξύ, α-κετογλουταρικό οξύ και ηλεκτρικό οξύ (Morgunoy et al., 2013).

Συγκεκριμένα, για την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος υπάρχουν τρεις πιθανές διαδρομές: η αναγωγική πορεία του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCA cycle), υπό αναερόβιες συνθήκες, η οξειδωτική πορεία του κύκλου του κιτρικού οξέος (είναι

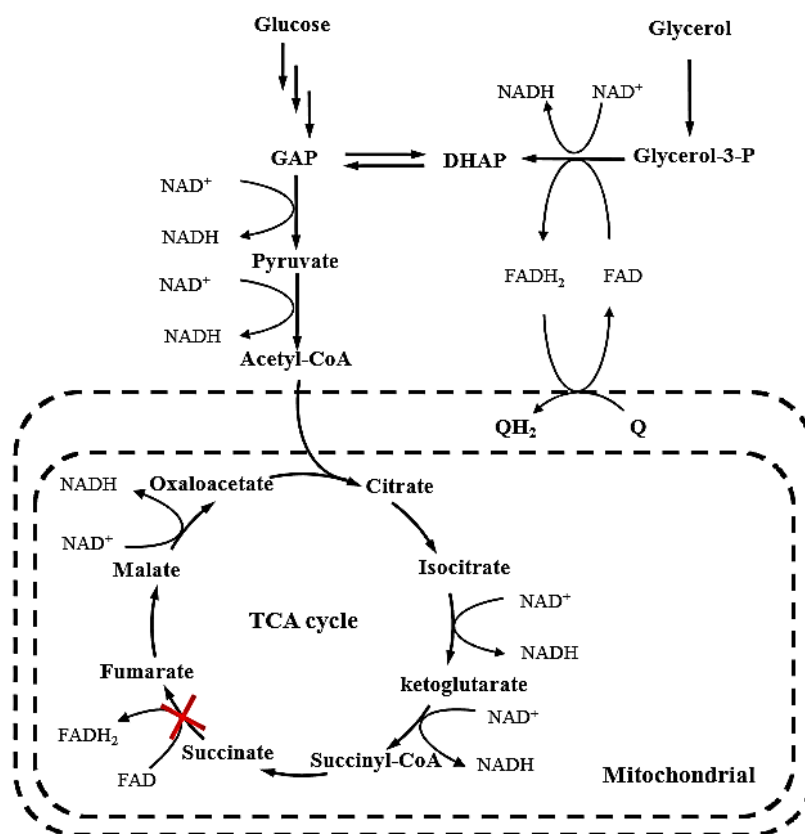
κυρίως υπό αερόβιες συνθήκες), και η πορεία του γλυοξυλικού, η οποία ουσιαστικά παρακάμπει τα δυο βήματα αποκαρβοξυλίωσης του κύκλου του κιτρικού οξέος.

Το ηλεκτρικό οξύ ως ενδιάμεσος μεταβολίτης του κύκλου του κιτρικού οξέος σχηματίζεται από μια ένωση τεσσάρων ατόμων άνθρακα (οξαλοξικό) με συμπίκνωση με μια ακετυλική ομάδα δυο ατόμων άνθρακα για να δώσει το τρικαρβοξυλικό οξύ (κιτρικό). Στην συνέχεια, το ισομερές του κιτρικού αποκαρβοξυλιώνεται μέσω οξειδωσης σε α-κετογλουταρικό οξύ. Το α-κετογλουταρικό οξύ μέσω του συμπλέγματος της α-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης μέσω οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης μετατρέπεται σε ηλεκτρυλο -CoA, ενώ η επόμενη αντίδραση καταλύεται από τη συνθετάση του ηλεκτρυλο -CoA για να παραχθεί το ηλεκτρικό. Ο κύκλος συνεχίζει με την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό μέσω της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (Berg et al., 2002). Το στάδιο αυτό έχει απενεργοποιηθεί στο μικροοργανισμό *Yarrowia lipolytica* με σκοπό να επιτευχθεί η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος. Στο στέλεχος *Y. lipolytica* P01f με διαγραφή του γονιδίου *Ylsdh5* του συμπλόκου της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH), το οποίο είναι υπεύθυνο για την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό (Εικόνα 1), ο κύκλος του κιτρικού σταματάει στην παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να παρατηρηθεί παραγωγή ηλεκτρικού οξέος αλλά επίσης προκλήθηκε απώλεια της ικανότητας μεταβολισμού της γλυκόζης.

Με σκοπό την βελτίωση του μεταβολισμού της γλυκόζης έχουν υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι, όπως για παράδειγμα η αύξηση της αναγωγικής δύναμης, η ρύθμιση του ενδοκυτταρικού ATP, η ρύθμιση της αναλογίας NADH/NAD⁺ και η διαδικασία της εξελικτικής προσαρμογής (adaptive evolution). Για τη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο στέλεχος είχε χρησιμοποιηθεί η τελευταία μέθοδος (Gao et al., 2016).

Το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* PSA02004 το οποίο χρησιμοποιείται στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη προήλθε από το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* PGC01003 με τη μέθοδο της εξελικτικής προσαρμογής (Yang et al., 2017). Μια σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με σκοπό να επιτευχθεί γενετική εξέλιξη του μικροοργανισμού είτε με ζύμωση ελεύθερων κυττάρων (free cell fermentation) είτε με ζύμωση ακινητοποιημένων κυττάρων (immobilized cell fermentation). Με σκοπό να επιτευχθεί υψηλότερη παραγωγή κυτταρικής βιομάζας στη μηδενική γενιά

χρησιμοποιήθηκαν 10 g/L γλυκερόλη σε 1% YPD (10% Εκχύλισμα ζύμης, 20% Τρυπτόνη και 20% Γλυκερόλη ή Γλυκόζη).



Εικόνα 1 Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής ηλεκτρικού οξέος από το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* (Yang et al., 2017)

Ακολούθως μεταφέρθηκε σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε 2,5% YPD το οποίο χαρακτηρίστηκε ως η πρώτη γενιά. Όταν η οπτική πυκνότητα (OD 600nm) έφτανε από 1,8-2,2 σε 24 ώρες η καλλιέργεια μεταφερόταν σε καινούργιο θρεπτικό μέσο με υψηλότερη αρχική συγκέντρωση γλυκόζης. Η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης αυξανόταν σταδιακά από 25-150 g/L. Μετά από 14 γενεές εξελικτικής προσαρμογής, παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε θρεπτικό μέσο YPD που περιείχε 150 g/L γλυκόζης και με τους δύο τρόπους ζύμωσης. Τα εξελιγμένα στελέχη PSA01 και PSA02 καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα (YPD agar), το οποίο περιείχε 150g/L γλυκόζη για την απομόνωση αποικιών με σταθερό φαινότυπο. Έξι

διαφορετικές μεμονωμένες αποικίες επιλέχθηκαν τυχαία από κάθε στέλεχος με σκοπό να ελεγχθεί ο μικροοργανισμός σε ζύμωση σε κωνικές φιάλες. Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο YPD με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 150 g/L, όπου επιτεύχθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε 24 ώρες. Δύο στελέχη από κάθε εξελιγμένο στέλεχος με τον υψηλότερο ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης, και πιο συγκεκριμένα PSA01009, PSA01020, PSA02004 και PSA02007, επιλέχθηκαν για σύγκριση χρησιμοποιώντας το αρχικό στέλεχος PGC01003. Αυτά τα τέσσερα στελέχη μεταφέρθηκαν για 10 γενεές σε θρεπτικό μέσο YPD που περιείχε αρχικά 150 g/L γλυκόζης. Από τα τέσσερα στελέχη, στο στέλεχος PSA02004 παρατηρήθηκε υψηλότερη τιμή ξηρής βιομάζας στη ζύμωση (Yang et al., 2017).

1.4 Πρώτες ύλες

Για την ανάπτυξη μιας αειφόρου βιοτεχνολογικής διεργασίας για παραγωγή χημικών προστιθέμενης υψηλής αξίας πρέπει να χρησιμοποιούνται χαμηλής αξίας υποστρώματα, τα οποία ενδεχομένως να προέρχονται από απόβλητα.

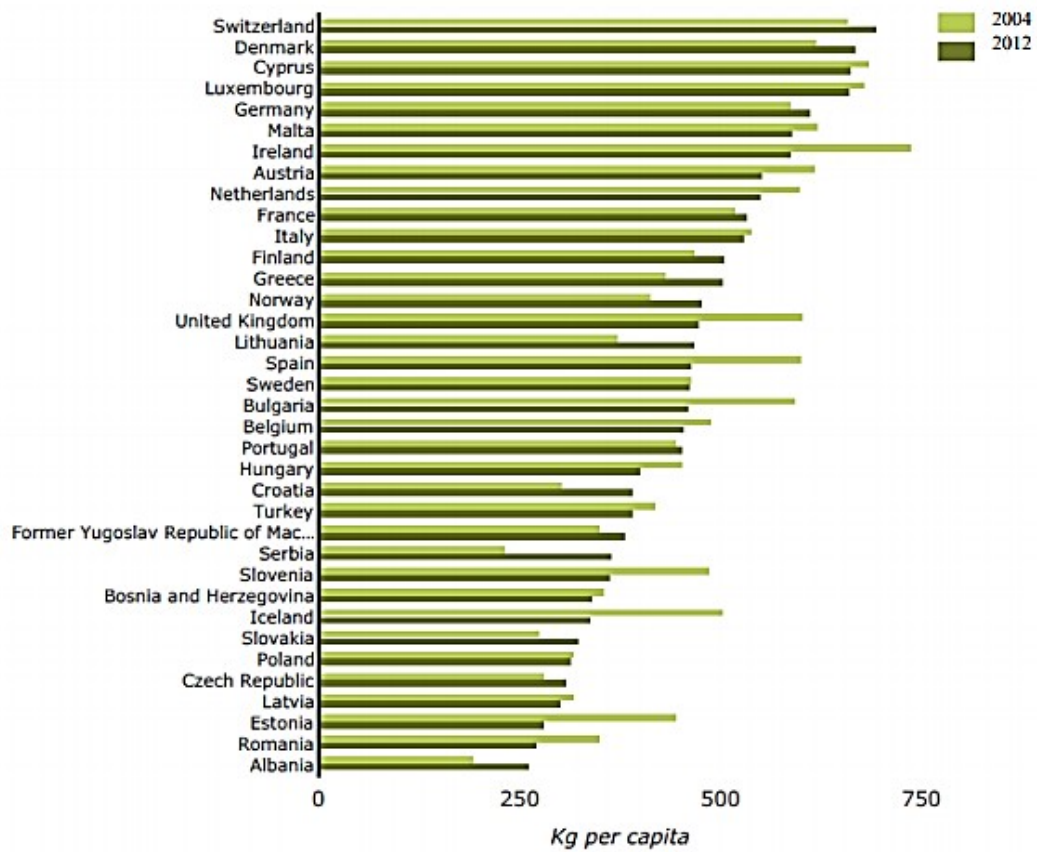
1.4.1 Αστικά στερεά απόβλητα

Σύμφωνα με τις Οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης 75/442/EEC και 91/156/EEC, ο όρος «απόβλητα» περιλαμβάνει όλες τις ουσίες και τα αντικείμενα τα οποία απορρίπτονται ή προβλέπεται να απορριφθούν ή απαιτείται να απορριφθούν: α) Βιομηχανικά υγρά απόβλητα, β) Αστικά και βιομηχανικά στερεά απόβλητα και ιλύς, γ) Αστικά λύματα, δ) Στερεά και υγρά παραπροϊόντα της εκμετάλλευσης ορυκτών πόρων, ε) Απόβλητα κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων, καθώς και λοιπές ανθρώπινες ενέργειες όπως γεωργικές δραστηριότητες, ατυχήματα από μεταφορά χημικών ουσιών, αστοχία τεχνικών έργων, ανεξέλεγκτη απόρριψη αποβλήτων ή και τυχαίες διαφυγές ρύπων από χώρους αποθήκευσης.

Επομένως, ως Αστικά στερεά απόβλητα σύμφωνα με τον πρόσφατο ορισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης θεωρούνται τα οικιακά απόβλητα καθώς και άλλα απόβλητα τα οποία λόγω φύσης ή σύνθεσης είναι παρόμοια με τα οικιακά. Ο ορισμός αυτός αν και ασαφής, διαχωρίζει τα αστικά στερεά απόβλητα από τρεις άλλες βασικές κατηγορίες, τα επικίνδυνα απόβλητα (κυρίως βιομηχανικά ή μολυσματικά), τα αδρανή απόβλητα

(κυρίως από οικοδομικές εργασίες) και τις ιλύες, για τα οποία προβλέπεται χωριστή συλλογή και επεξεργασία/διάθεση (Ανδρεαδάκης κ.ά., 2008).

Σύμφωνα με το «Waste-municipal solid waste generation and management», η συνολική παραγωγή αστικών αποβλήτων στις χώρες της ΕΕ μειώθηκε κατά 1% από το 2004 μέχρι το 2012. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε ομοιόμορφη τάση σε όλες τις χώρες της ΕΕ, αλλά σε 15 από αυτές υπήρξε αύξηση παραγωγής αστικών αποβλήτων ανά κάτοικο και στις υπόλοιπες μείωση (European Environment Agency 2015). Σύμφωνα με το Διάγραμμα 2 το 2012 η Ελβετία είχε την υψηλότερη παραγωγή αστικών αποβλήτων ανά κάτοικο (694 kg/κάτοικο), με δεύτερη τη Δανία (668 kg/κάτοικο) και στη συνέχεια η Κύπρος (663 kg/κάτοικο). Τη χαμηλότερη παραγωγή αστικών αποβλήτων παρουσιάζει η Ρουμανία (271 kg/κάτοικο) και η Αλβανία (262 kg/κάτοικο) (www.europa.eu). Η παραγωγή αποβλήτων είναι αναπόφευκτη, επομένως οι τεχνολογίες για την ανάκτηση ενώσεων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και περαιτέρω αξιοποίηση τους σε διάφορες εμπορικές εφαρμογές είναι υψηλής σημασίας. Τα αστικά στερεά απόβλητα λόγω της σύστασής τους έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, χρησιμοποιώντας χημικές και μικροβιακές διεργασίες. Η πλειοψηφία αυτών των προϊόντων, όπως είναι το μεθάνιο, η βιοαιθανόλη και η ενέργεια (ηλεκτρική ενέργεια), προέρχεται από βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αερόβιας και αναερόβιας ζύμωσης (Wyk, 2001).



Διάγραμμα 2: Αστικά στερεά απόβλητα που παράγονται ανά κάτοικο στη ΕΕ το 2004 και 2012

1.5 Σκοπός της μελέτης

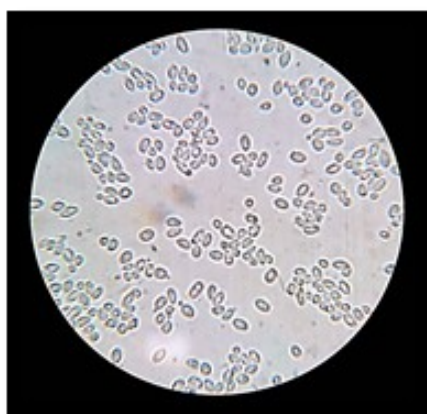
Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν η αξιοποίηση του οργανικού κλάσματος αστικών στερεών αποβλήτων (Municipal Solid Waste, MSW) για τη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και ανάπτυξη της βιομάζας μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με τη χρήση του γενετικά τροποποιημένου στελέχους *Yarrowia lipolytica* PSA02004.

Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα με τη χρήση μείγματος εμπορικών σακχάρων ίδιας σύστασης με αυτή του υδρολύματος αστικών αποβλήτων σε συνθετικό υπόστρωμα. Επίσης, η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα και αζώτου μελετήθηκε και με το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων. Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκε η αξιοποίηση του οξικού οξέος ως πιθανή εναλλακτική πηγή άνθρακα για τη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος σε ασυνεχείς και ημι-συνεχείς ζυμώσεις με προσθήκη ή χωρίς προσθήκη οξικού οξέος στην αρχή της ζύμωσης ή και στη διάρκεια ως τροφοδοσία.

2 Μεθοδολογία έρευνας

2.1 Βιολογικό υλικό

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για τη παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είναι το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* PSA02004. Στο συγκεκριμένο μικροοργανισμό, μακροχρόνια αποθήκευση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία -80 °C σε διάλυμα γλυκερόλης (50% v/v) προκειμένου να διατηρηθούν βιώσιμα τα κύτταρα για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, εφόσον κάτω από τέτοιες συνθήκες οι διάφορες λειτουργίες αναστέλλονται.



Εικόνα 2 Στέλεχος *Yarrowia lipolytica* PSA02004

2.2 Προετοιμασία υγρού εμβολίου

Η παρασκευή και ανάπτυξη του υγρού εμβολίου ή αλλιώς προκαλλιέργεια έγινε σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες μέχρι 50 mL, με θρεπτικό μέσο αποτελούμενο από 2% γλυκερόλη, 1% εκχύλισμα ζύμης, 2% τρυπτόνη και ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού νατρίου Na_2HPO_4 20mM (Buffer solution). Τα διάφορα υλικά και θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά στους 121°C. Τέλος, οι κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν με ένα φιαλίδιο (Cryo Vial), στο οποίο φυλασσόταν το εναιώρημα κυττάρων. Ακολούθως οι κωνικές επωάστηκαν για 22-24 ώρες στους 28°C με ανάδευση 220 rpm.

2.3 Προ-επεξεργασία υδρολύματος αστικών αποβλήτων και προσδιορισμός της σύστασης του

Το απόβλητο προ επεξεργάστηκε για την απομάκρυνση των στερεών, αρχικά με φυγοκέντρηση στους 4 °C και 10000 rpm, και ακολούθως με τη χρήση κόσκινου. Το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων αναλύθηκε ως προς τη σύσταση του σε σάκχαρα και γλυκερόλη, προσδιορισμό αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων και ανόργανου φωσφόρου.

Το συγκεκριμένο υδρόλυμα αστικών αποβλήτων χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα και αζώτου για τη βιοτεχνολογική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος ζύμης *Yarrowia lipolytica* PSA02004.

2.4 Μελέτη επίδρασης αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα

2.4.1 Χρήση εμπορικών σακχάρων σε συνθετικό υπόστρωμα ως πηγή άνθρακα

Για την μελέτη της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης εμπορικών σακχάρων στη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος και στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, διεξήχθησαν ασυνεχείς ζυμώσεις από τον μικροοργανισμό *Yarrowia lipolytica* PSA02004 με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων ως κύρια πηγή άνθρακα. Οι αρχικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν κυμαίνονταν από 30 g/L-200 g/L (30, 50, 70, 100, 150 και 200 g/L). Η αναλογία των εμπορικών σακχάρων που χρησιμοποιήθηκε ήταν ίδια με τη σύσταση σακχάρων του υδρολύματος αστικών αποβλήτων. Ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο με σύσταση 1% εκχύλισμα ζύμης, 2 % τρυπτόνη και ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού νατρίου Na_2HPO_4 20mM (Buffer solution) με τελικό ενεργό όγκο 50 mL. Το εμβόλιο αποτελούσε το 10% του ενεργού όγκου της ζύμωσης. Το pH της ζύμωσης διατηρείτο στο 6,0 με χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου NaOH 5M . Οι συνθήκες ζύμωσης ήταν σταθερά στους 28 °C με ταχύτητα ανάδευσης 220 rpm. Για την παρακολούθηση των ζυμώσεων λαμβάνονταν κατά διαστήματα δείγματα (1mL) υπό ασηπτικές συνθήκες.

Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά στους 121°C, με τη πηγή άνθρακα να αποστειρώνεται ξεχωριστά.

2.4.2 Χρήση υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου

Για την σύγκριση της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης εμπορικών σακχάρων στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος αλλά και στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον ασυνεχείς ζυμώσεις με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων, ως κύρια πηγή άνθρακα. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του υδρολύματος επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα από τις ασυνεχείς ζυμώσεις σε συνθετικό υπόστρωμα εμπορικών σακχάρων (50, 70, 100 και 150 g/L). Το εμβόλιο αποτελούσε το 10% του ενεργού όγκου της ζύμωσης. Το pH της ζύμωσης διατηρείτο στο 6,0 με χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου NaOH 5M. Οι συνθήκες της ζύμωσης ήταν σταθερά στους 28 °C με ταχύτητα ανάδευσης 220 rpm. Για την παρακολούθηση των ζυμώσεων λαμβάνονταν κατά διαστήματα δείγματα (1mL) υπό ασηπτικές συνθήκες.

Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά στους 121°C, με τη πηγή άνθρακα να αποστειρώνεται ξεχωριστά.

2.5 Μελέτη κατανάλωσης οξικού οξέος με χρήση γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα

2.5.1 Ασυνεχείς ζυμώσεις

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε μελέτη κατανάλωσης οξικού οξέος σε ασυνεχείς ζυμώσεις προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με τη χρήση του μικροοργανισμού *Yarrowia lipolytica* PSA02004. Για τη μελέτη της κατανάλωσης ή μη του οξικού οξέος ως πηγή άνθρακα διεξήχθησαν τα παρακάτω πειράματα. Αρχικά, σε όλες τις ασυνεχείς ζυμώσεις, ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση ίση με 30 g/L. Τρεις διαφορετικές περιπτώσεις μελετήθηκαν. Στη πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα, ενώ στη δεύτερη περίπτωση 30 g/L γλυκερόλης και αρχική προσθήκη οξικού οξέος 10 g/L προστέθηκαν. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ζύμωση με αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος 10 g/L, χωρίς προσθήκη άλλης πηγής άνθρακα.

Το θρεπτικό μέσο περιείχε 1% εκχύλισμα ζύμης, 2 % τρυπτόνη και ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού νατρίου Na₂HPO₄ 20mM (Buffer solution) με τελικό

ενεργό όγκο 50 mL. Το εμβόλιο αποτελούσε το 10% του ενεργού όγκου της ζύμωσης. Το pH της ζύμωσης διατηρείτο στο 6,0 με χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου NaOH 5M. Οι συνθήκες των ζυμώσεων ήταν σταθερά στους 28 °C με ταχύτητα ανάδευσης 220 rpm. Για την παρακολούθηση των ζυμώσεων λαμβάνονταν κατά διαστήματα δείγματα (1mL) υπό ασηπτικές συνθήκες.

Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά στους 121°C, με τη πηγή άνθρακα να αποστειρώνεται ξεχωριστά.

2.5.2 Ημι-συνεχείς ζυμώσεις

Ακολούθως μια σειρά από ημι-συνεχείς ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη μελέτη κατανάλωσης οξικού οξέος σε συνθετικό υπόστρωμα. Δύο διαφορετικές πηγές άνθρακα μελετήθηκαν: γλυκερόλη και μίγμα εμπορικών σακχάρων ίδιας αναλογίας με τη σύσταση σακχάρων του υδρολύματος αστικών αποβλήτων. Η αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα που επιλέχθηκε ήταν 150 g/L χωρίς αρχική προσθήκη ποσότητας οξικού οξέος, αλλά και με αρχική προσθήκη ποσότητας οξικού οξέος 6g/L και στις δύο περιπτώσεις. Πυκνό διάλυμα γλυκερόλης ή μείγμα σακχάρων και γλυκερόλης προστίθεται όταν η συγκέντρωση των σακχάρων στο υγρό της ζύμωσης μειωνόταν στα 20-30 g/L.

Το θρεπτικό μέσο περιείχε 1% εκχύλισμα ζύμης, 2 % τρυπτόνη και ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού νατρίου Na₂HPO₄ 20mM (Buffer solution) με τελικό ενεργό όγκο 50 mL. Το εμβόλιο αποτελούσε το 10% του ενεργού όγκου της ζύμωσης. Το pH της ζύμωσης διατηρείτο στο 6,0 με χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου NaOH 5M. Οι συνθήκες των ζυμώσεων ήταν σταθερά στους 28 °C με ταχύτητα ανάδευσης 220 rpm. Για την παρακολούθηση των ζυμώσεων λαμβάνονταν κατά διαστήματα δείγματα (1mL) υπό ασηπτικές συνθήκες.

Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά στους 121°C, με τη πηγή άνθρακα να αποστειρώνεται ξεχωριστά.

2.6 Μέθοδοι ανάλυσης

2.6.1 Προσδιορισμός σακχάρων και δευτερογενών μεταβολιτών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός των σακχάρων και των δευτερογενών μεταβολιτών της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με τη χρήση του συστήματος SHIMADZU UFLC XR. Συγκεκριμένα, η στήλη με την οποία επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του δείγματος ήταν τύπου Phenomenex Rezex ROA (300mm x 7,8mm). Η ταυτοποίηση των διάφορων χημικών ενώσεων, καταναλωθέντων σακχάρων και παραγόμενων προϊόντων ζύμωσης, βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά πρότυπα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα H₂SO₄ (10mM), η ροή κατά την ανάλυση των δειγμάτων ήταν καθορισμένη στο 0,6 mL/min, με τη θερμοκρασία στήλης να είναι στους 65 °C. Από τη στήλη περνούσαν 10 μL δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 24 λεπτά.

2.6.2 Προσδιορισμός βιομάζας

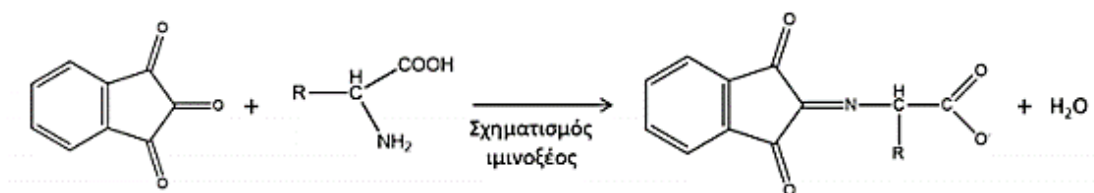
Ο ποσοτικός προσδιορισμός της βιομάζας πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του ξηρού βάρους. Πιο αναλυτικά, για τα διάφορα σημεία της ζύμωσης όπου γινόταν δειγματοληψία 1mL, 1 mL δείγματος τοποθετήθηκαν σε eppendorf χωρητικότητας 2 mL και ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 λεπτά σε 10000 rpm σε φυγόκεντρο τύπου Hitachi U-2000 (Japan). Στη συνέχεια έγινε έκπληση των κυττάρων με χρήση απιονισμένου νερού και τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για δεύτερη φορά. Έπειτα ακολούθησε μεταφορά της βιομάζας σε προ-ζυγισμένα φιαλίδια τα οποία τοποθετήθηκαν στο φούρνο ξήρανσης σε θερμοκρασία 70±5 °C μέχρι σταθεροποίηση του βάρους τους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγιζόταν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και εκφραζόταν σε g/L.

Επιπρόσθετα, προσδιορισμός της βιομάζας έγινε και έμμεσα με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος (Optical density, OD). Από τα 1 mL δείγματος, μικρή ποσότητα δείγματος μετά από κατάλληλη αραιώση με χρήση απιονισμένου νερού τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα χωρητικότητας 2 mL. Τέλος πραγματοποιήθηκε

μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 630 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής θλάσεως τύπου Hitachi.

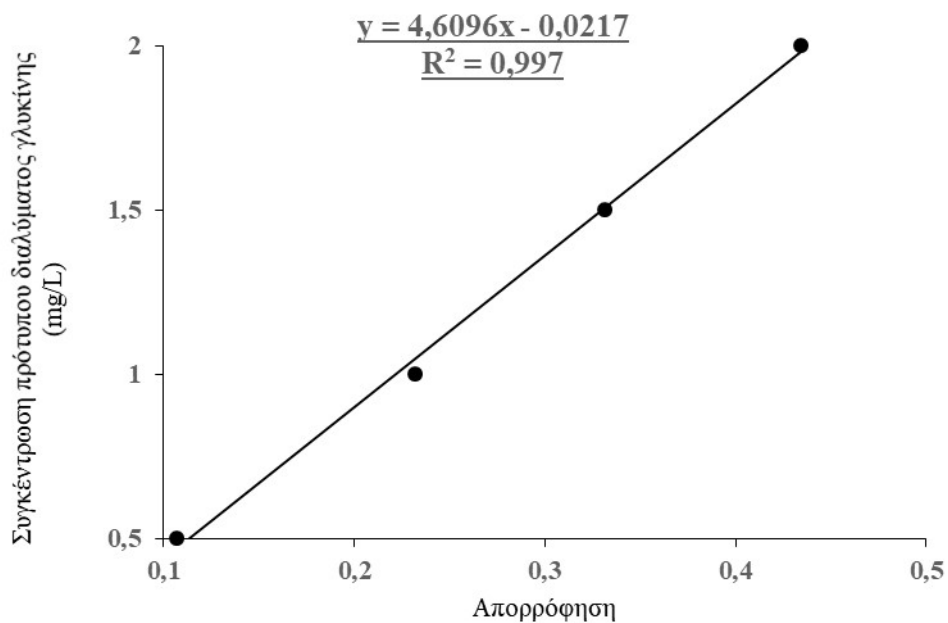
2.6.3 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (Free Amino Nitrogen, FAN)

Για το ποσοτικό προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων χρησιμοποιήθηκε η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie, 1973). Η νινυδρίνη έχει τη δυνατότητα να αντιδρά με τα αμινοξέα και να παράγει μωβ χρώμα, το οποίο ανιχνεύεται σε μήκος κύματος 570 nm με τη μέθοδο που αναλύεται στη συνέχεια. Η ένταση του χρώματος που παράγεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αμινοξέων που περιέχονται στο δείγμα. Η τελική αντίδραση της νινυδρίνης περιγράφεται στην εικόνα 3 ως εξής:



Εικόνα 3 Η αντίδραση που πραγματοποιείται κατά τη μέθοδο προσδιορισμού FAN

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος, 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (colour reagent) και ακολουθεί ανάδευση. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίζονται και μεταφέρονται σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 16 λεπτά. Ακολουθεί ψύξη των δειγμάτων για 20 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσεως (dilution reagent) και ανάδευση μέχρι αλλαγή χρώματος για 20 δευτερόλεπτα. Τέλος, μετράται η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U.2000 Spectrophotometer) στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου, περιέχει 1 mL απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση του δείγματος σε FAN υπολογίζεται από πρότυπες καμπύλες αναφοράς, εκφρασμένη σε mg/L (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της ποσότητας FAN σε mg/L.

Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθείται η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης. Η σύσταση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιείται για την μέθοδο FAN περιγράφεται στο πίνακα 1.

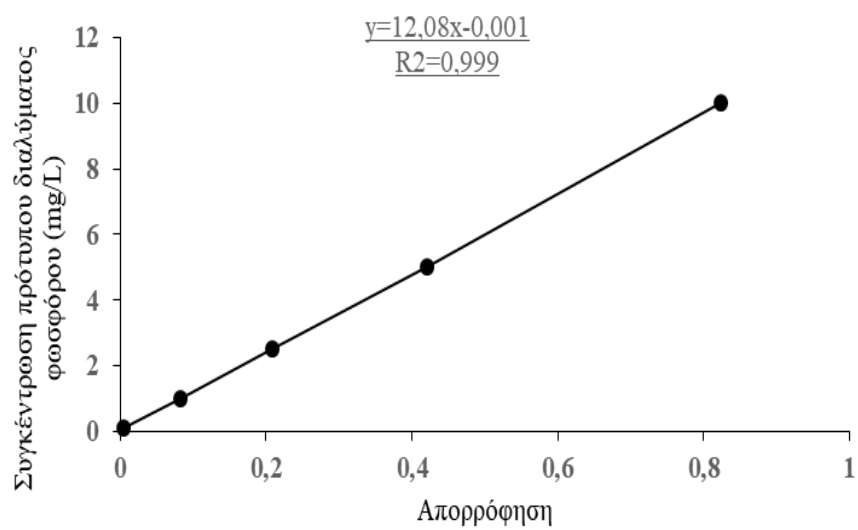
Πίνακας 1: Σύσταση αντιδραστηρίων για την μέτρηση FAN

Αντιδραστήρια για την μέτρηση FAN	Σύσταση
Colour reagent	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 49,71 g όξινο φωσφορικό δινάτριο ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη και περίπου 60 g όξινο διφωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) διαλυμένα σε 1 L αποσταγμένο νερό. ▪ pH: 6,6-6,8 ▪ Αποθήκευση: 4 °C
Dilution reagent	2 g ιωδικού καλίου (KIO_3) σε 616 ml αποσταγμένο νερό και προσθήκη 384 mL αιθανόλης (καθαρότητας 100%).
Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0,1072 g γλυκίνης σε 100 mL αποσταγμένο νερό ▪ Αποθήκευση: 4 °C
Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 mL διαλύματος γλυκίνης σε 100 mL αποστειρωμένο νερό ▪ 2 mL από το παραπάνω διάλυμα περιέχει 2 mg/L FAN.

2.6.4 Προσδιορισμός του ανόργανου φωσφόρου (Inorganic Phosphorus Analysis, IP)

Η ανάλυση της συγκέντρωσης του φωσφόρου έχει ως εξής: Αρχικά πραγματοποιείται κατάλληλη αραιώση δείγματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες (2 ανά δείγμα) με τελικό όγκο 5 mL. Γίνεται προσθήκη σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 0,4 mL 60 % v/v διαλύματος υπερχλωρικού οξέος (Fisons, England) και ανακίνηση για 20 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 0,3 mL διαλύματος ασκορβικού οξέος 1% w/v και ανακίνηση για 20 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί προσθήκη 0,4 mL διαλύματος αμμωνιακού μολύβδου 5% w/v και ανακίνηση για 20 δευτερόλεπτα. Αναμονή για 10 λεπτά ώστε να αναπτυχθεί μπλέ χρώμα και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm με την χρήση φασματοφωτόμετρου (U-2000, Spectrophotometer, Hitachi). Χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό ως τυφλό για το μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου.

Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του φωσφόρου σε σχέση με την απορρόφηση φαίνεται στο Διάγραμμα 4.



Διάγραμμα 4 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της ποσότητας IP σε mg/L.

3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 Σύσταση υδρολύματος αστικών αποβλήτων

Στο πίνακα 2 παρουσιάζεται η σύσταση του υδρολύματος αστικών αποβλήτων που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη. Το μεγαλύτερο ποσοστό σακχάρων αποτελεί η γλυκόζη, με ποσοστό 84,47 %, ενώ ακολουθούν η ξυλόζη (8,44%) και η σακχαρόζη (2,06 %). Σε μικρότερες ποσότητες υπάρχει η γαλακτόζη, αραβινόζη, μαννόζη και φρουκτόζη. Ωστόσο, σε ποσοστό 2,23% περιλαμβάνεται και η γλυκερόλη, μια αλκοόλη η οποία μεταβολίζεται επαρκώς ως πηγή άνθρακα από το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* PSA02004 προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Επίσης, η ποσότητα του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων στο υδρόλυμα αστικών αποβλήτων ήταν $638 \pm 0,85$ mg/L και η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου ήταν $100,6 \pm 0,50$ mg/L. Η ποσοτικοποίηση της ήδη υπάρχουσας πηγής αζώτου του υδρολύματος και η κατανάλωση της κατά την διάρκεια της ζύμωσης προσδιορίστηκε με βάση την φωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης (υποκεφάλαιο 2.9.3), ενώ η αρχική ποσότητα του φωσφόρου και η κατανάλωση του κατά την διάρκεια της ζύμωσης προσδιορίστηκε με βάση την φωτομετρική μέθοδο που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.9.4.

Πίνακας 2: Σύσταση υδρολύματος αστικών αποβλήτων

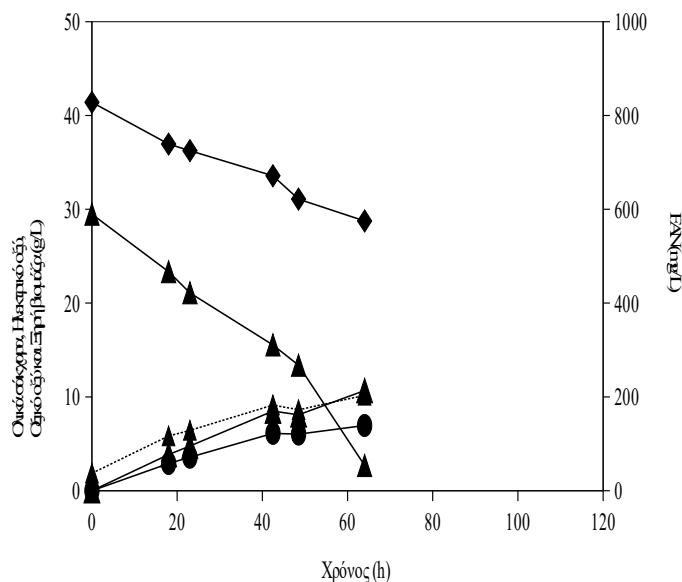
Πηγή άνθρακα και γλυκερόλη	Ποσοστό (%)
Σακχαρόζη	2,06
Γλυκόζη	84,47
Ξυλόζη	8,44
Γαλακτόζη	1,58
Αραβινόζη	0,57
Μαννόζη	0,22
Φρουκτόζη	0,41
Γλυκερόλη	2,23

3.2 Μελέτη επίδραση αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα

3.2.1 Χρήση εμπορικών σακχάρων σε συνθετικό υπόστρωμα ως πηγή άνθρακα

Για τη βελτιστοποίηση της ζύμωσης μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες και η σύσταση του θρεπτικού μέσου ήταν η ίδια για όλες τις συγκεντρώσεις πειραμάτων.

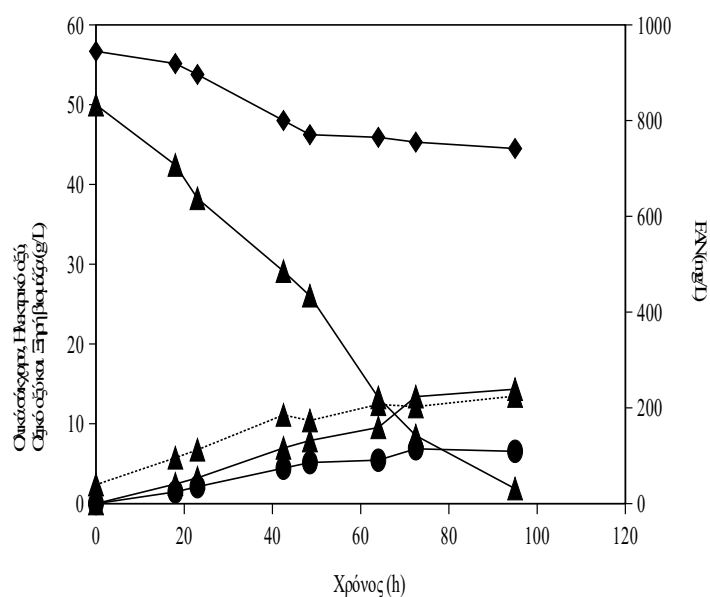
Με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L, (Διάγραμμα 5) η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 64 ώρες με παραγόμενο ηλεκτρικό οξύ 10,68 g/L και 10,17 g/L κυτταρική βιομάζα και μέγιστη απόδοση 0,36 g/g. Στο τέλος της ζύμωσης, η παραγωγικότητα που σημειώθηκε ήταν 0,17g/L/h και η παραγωγή του οξικού οξέος έφτασε τα 7g/L χωρίς να καταναλώνεται από τον μικροοργανισμό.



Διάγραμμα 5 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (▲), οξικό οξύ (●), Ξηρή βιομάζα (-▲-) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (◇) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L.

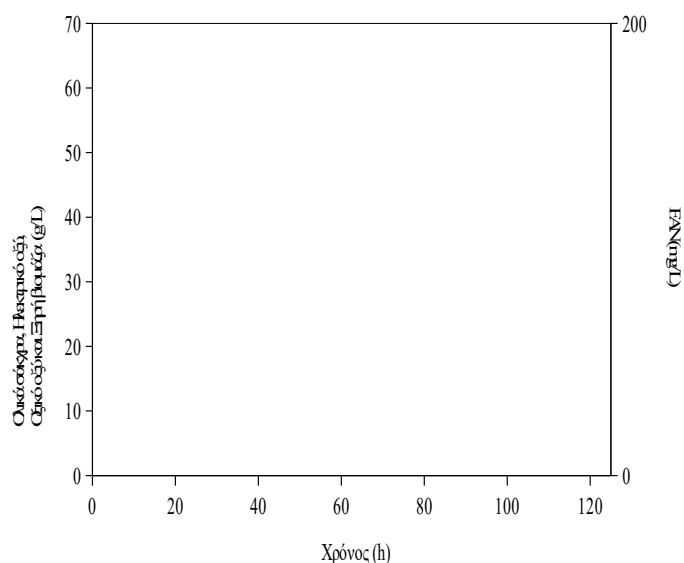
Με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 50g/L, (Διάγραμμα 6) η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 95 ώρες με τελική συγκέντρωση του επιθυμητού προϊόντος 14,33g/L και παραγωγή βιομάζας 13,47g/L με απόδοση 0,29g/g και παραγωγικότητα 0,15 g/L/h. Η τελική

συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν 6,55g/L. Τέλος, το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων που είχε καταναλώσει ήταν περίπου 146mg/L.



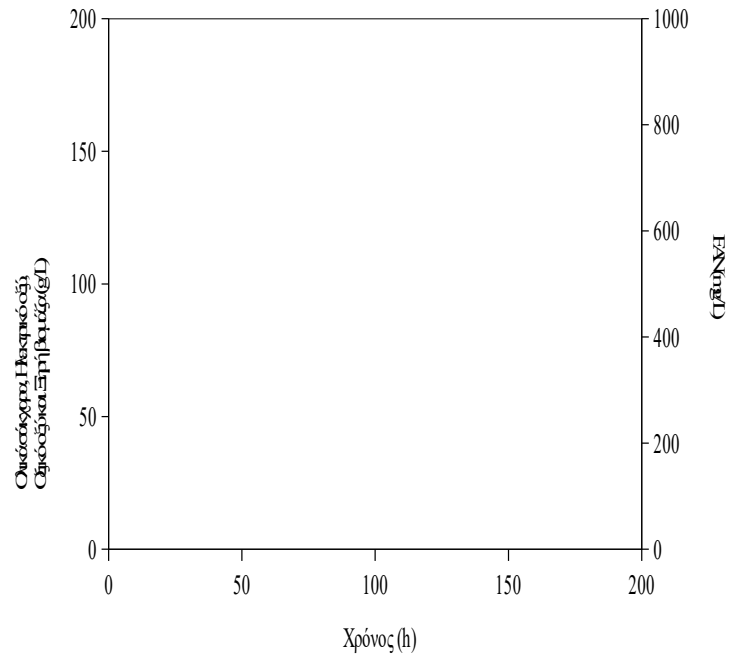
Διάγραμμα 6 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (\blacktriangle), οξικό οξύ (\bullet), ξηρή βιομάζα ($- \blacktriangle -$) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (\blacklozenge) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 50 g/L.

Με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 70 g/L, (Διάγραμμα 7) η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 118 ώρες με παραγόμενο ηλεκτρικό οξύ 22,2 g/L και η παραγωγή της βιομάζας είχε φτάσει 16,60 g/L. Στο τέλος της ζύμωσης η απόδοση ήταν 0,33g/g, ενώ αντίστοιχα η παραγωγικότητα 0,17g/L/h. Η παραγωγή του οξικού οξέος στο τέλος της ζύμωσης ήταν 4,05 g/L. Κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων καταναλώνεται μέχρι τις πρώτες 60 ώρες της ζύμωσης ενώ στη συνέχεια παραμένει σταθερό.



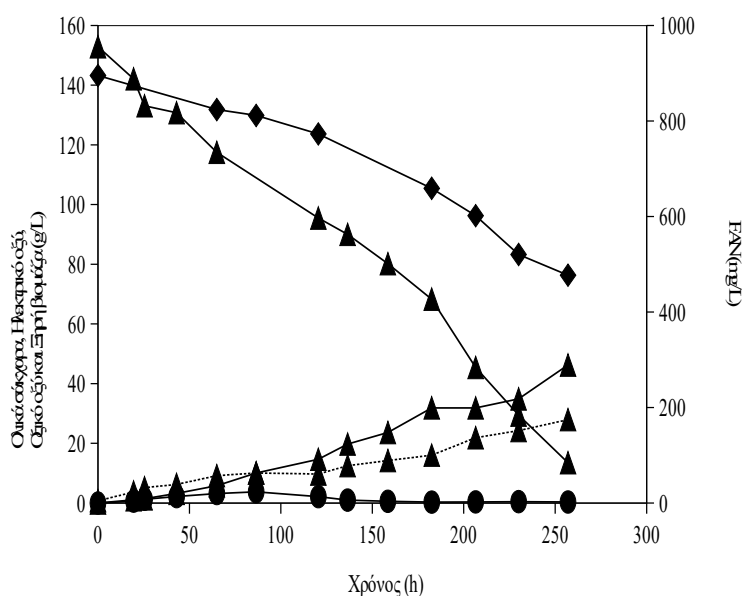
Διάγραμμα 7 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (\blacktriangle), οξικό οξύ (\square), ξηρή βιομάζα ($-\blacktriangle-$) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (\diamond) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 70 g/L.

Με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 100g/L, (Διάγραμμα 8) η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 185 ώρες με τελική συγκέντρωση του επιθυμητού προϊόντος 35g/L και παραγωγή βιομάζας 18,43g/L. Η απόδοση και η παραγωγικότητα στο τέλος της ζύμωσης ήταν 0,32 g/g και 0,19g/L/h, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος στο τέλος της ζύμωσης ήταν 1,4g/L με μέγιστη παραγωγή 5,4g/L στις 70 ώρες ενώ στη συνέχεια μειώθηκε. Φαίνεται λοιπόν, ότι το οξικό οξύ ξεκινά να καταναλώνεται ως εναλλακτική πηγή άνθρακα για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τέλος, καταναλώθηκαν περίπου 300 mg/L άζωτο ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων.



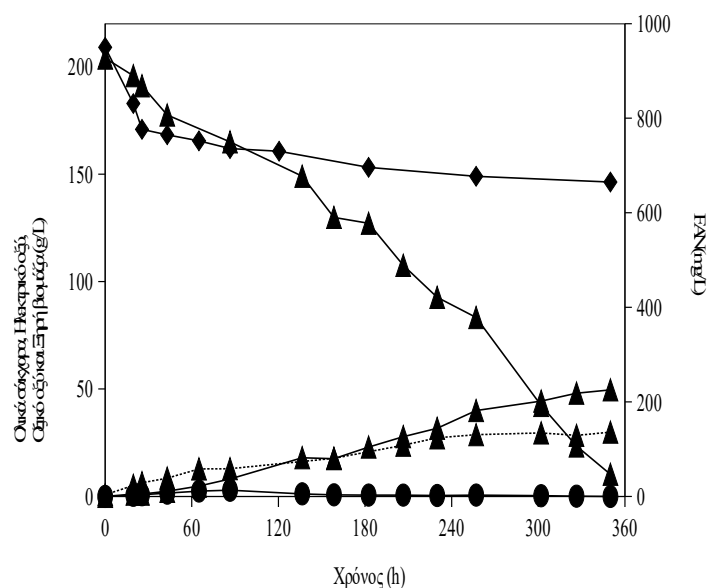
Διάγραμμα 8 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (\blacktriangle), οξικό οξύ (\square), ξηρή βιομάζα ($- \blacktriangle -$) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (\diamond) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 100 g/L.

Με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 150g/L, (Διάγραμμα 9) η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 257 ώρες με τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος και βιομάζας 46g/L και 28g/L αντίστοιχα. Η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,33g/g ενώ η παραγωγικότητα ήταν 0,18g/L/h. Τέλος, το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων που καταναλώθηκε ήταν περίπου 500mg/L. Το οξικό οξύ σε αυτή τη περίπτωση καταναλώθηκε πλήρως από το μικροοργανισμό.



Διάγραμμα 9 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (▲), οξικό οξύ (□), Ξηρή βιομάζα (-▲-) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (◇) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 150 g/L.

Με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 200g/L, (Διάγραμμα 10) η ζύμωση διήρκεσε 350 ώρες και η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος ήταν 50g/L. Αντίστοιχα η παραγωγή της βιομάζας έφτασε 30g/L. Η απόδοση και παραγωγικότητα της ζύμωσης ήταν 0,24g/g και 0,14 g/L/h. Η παραγωγή του οξικού οξέος έφτασε 2,88 g/L στις 86 ώρες της ζύμωσης όπου στη συνέχεια καταναλώθηκε πλήρως. Η κατανάλωση του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων ήταν περίπου 670mg/L.

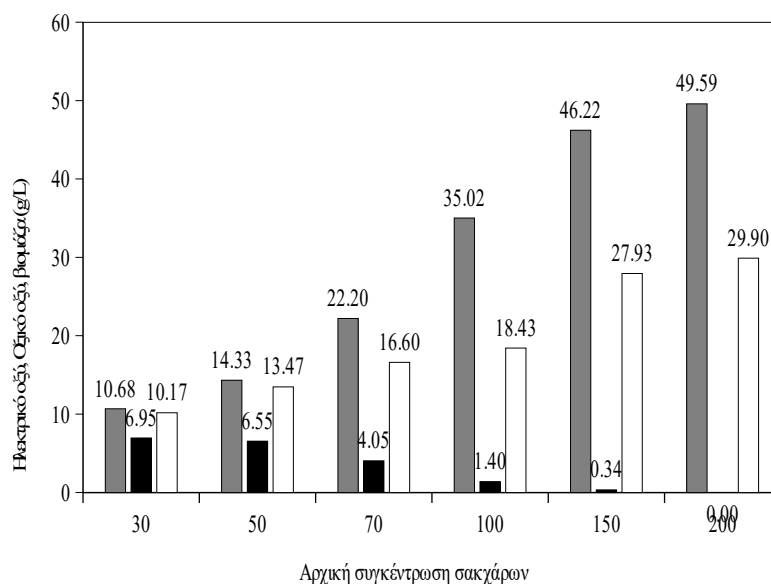


Διάγραμμα 10 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (▲), οξικό οξύ (○), ζηρή βιομάζα (-▲-) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (◇) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 200 g/L.

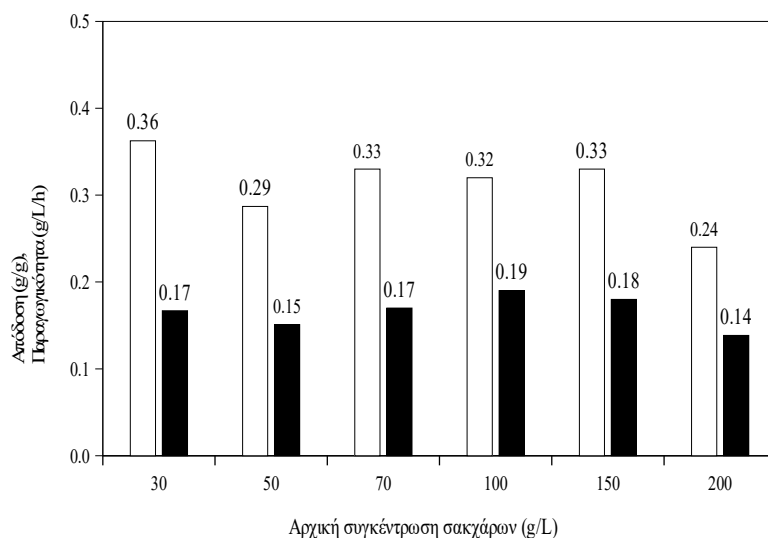
Στο Διάγραμμα 11 παρουσιάζονται η τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού, οξικού οξέος και βιομάζας για τα πειράματα με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα. Όπως παρατηρείται, η παραγωγικότητα και η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος επηρεάζεται από την αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 12. Παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με την αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα από 30-150 g/L, ενώ περαιτέρω αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα είχε αρνητική επίδραση στην παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος. Η μέγιστη συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος (49,6 g/L) πραγματοποιήθηκε στην καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 200 g/L, ενώ η τελική συγκέντρωση οξικού οξέος ήταν μηδενική. Η τελική συγκέντρωση του οξικού οξέος μειώνεται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός παρουσιάζει υψηλή ανθεκτικότητα σε υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα. Παρ' όλα αυτά η υψηλή συγκέντρωση πηγής άνθρακα 200 g/L φαίνεται να παρουσιάζει παρεμπόδιση του

μικροοργανισμού, γι' αυτό τον λόγο οφείλεται η χαμηλή παραγωγικότητα (0,24 g/L/h) της ζύμωσης. Έχει παρατηρηθεί ότι η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων προκαλεί οσμωτικό στρες στα κύτταρα της ζύμης, με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και την περαιτέρω παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με αποτέλεσμα μείωση της παραγωγικότητας, όπως προκύπτει και από άλλες αναφορές (Ong et al.,2019, Li et al.,2018).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα από 50 έως 150 g/L επιλέχθηκαν για να μελετηθεί η επίδραση του υδρόλυματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού και παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος.



Διάγραμμα 11 Ηλεκτρικό οξύ (g/L) (■), Οξικό οξύ (g/L) (■) και βιομάζα g/L (□) με τη χρήση εμπορικών σακχάρων σε συνθετικό υπόστρωμα σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων.

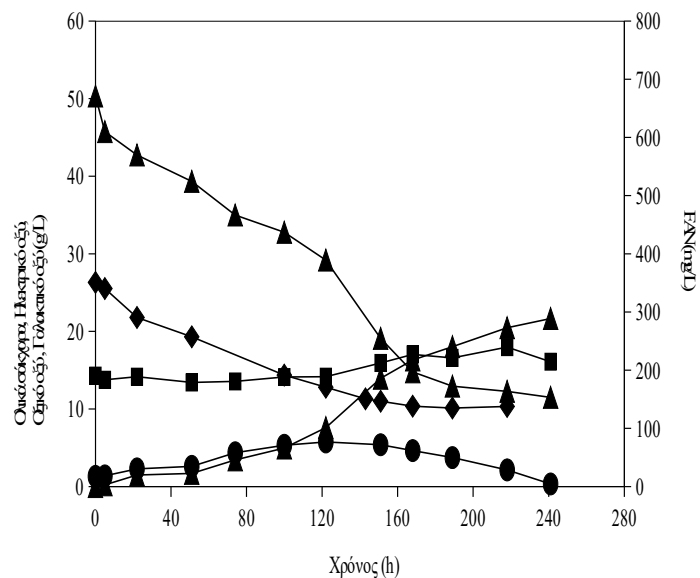


Διάγραμμα 12 Συντελεστής απόδοσης g/g (□) και παραγωγικότητα g/L/h (■) με τη χρήση εμπορικών σακχάρων σε συνθετικό υπόστρωμα σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων.

3.2.2 Χρήση υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου

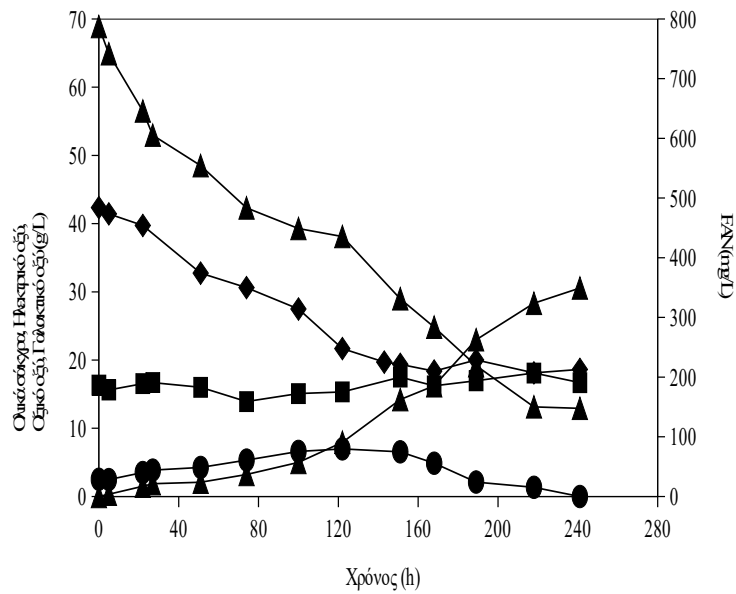
Αντίστοιχα με τη προηγούμενη ενότητα μελετήθηκε η επίδραση του υποστρώματος στη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος με τη χρήση υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων από 50-200 g/L.

Με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 50g/L, (Διάγραμμα 13) η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 241 ώρες με μέγιστη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος 21,65 g/L και συνολικά μη καταναλωθέντα σάκχαρα 12g/L. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε 0,43 g/g και παραγωγικότητα 0,09 g/L/h. Επίσης, η αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος στο υγρό της καλλιέργειας ήταν 1,3g/L, όπου η συγκέντρωση έφτασε 5,5g/L περίπου στις 100 ώρες ζύμωσης, ενώ μέχρι το τέλος της ζύμωσης είχε καταναλωθεί πλήρως. Τέλος, αρχική συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (περίπου 15g/L) στο μέσο της ζύμωσης, η οποία προερχόταν από το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων παρέμεινε σταθερή καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης.



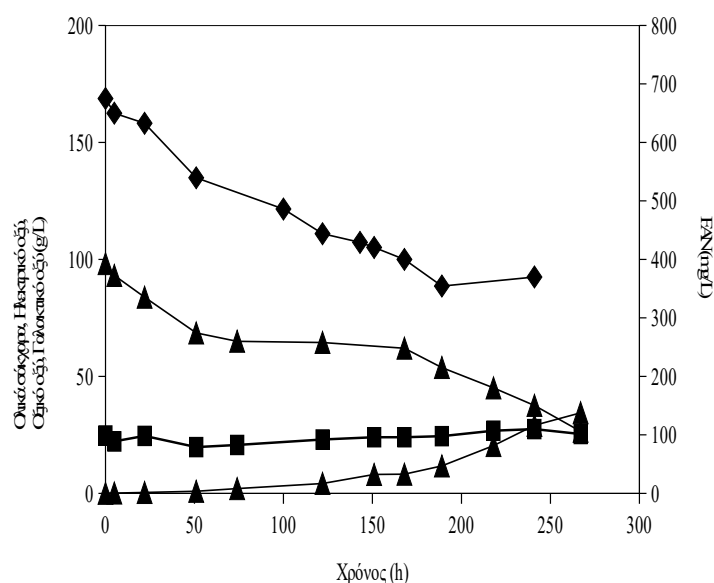
Διάγραμμα 13 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (▲), Οξικό οξύ (◻), Γαλακτικό οξύ (●) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (◊) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση υδρολύματος 50 g/L.

Με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 70g/L, (Διάγραμμα 14) η ζύμωση διήρκησε 241 ώρες με τη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος να φτάνει τα 30g/L και συνολικά μη καταναλωθέντα σάκχαρα 13g/L. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε 0,44 g/g και η παραγωγικότητα 0,13g/L/h. Επίσης, με αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος 2,5g/L στο μέσο καλλιέργειας, η μέγιστη συγκέντρωση του έφτασε στα 7g/L περίπου στις 122 ώρες, και ακολούθως ξεκινάει να καταναλώνεται ώσπου μέχρι το τέλος της ζύμωσης είχε καταναλωθεί πλήρως.



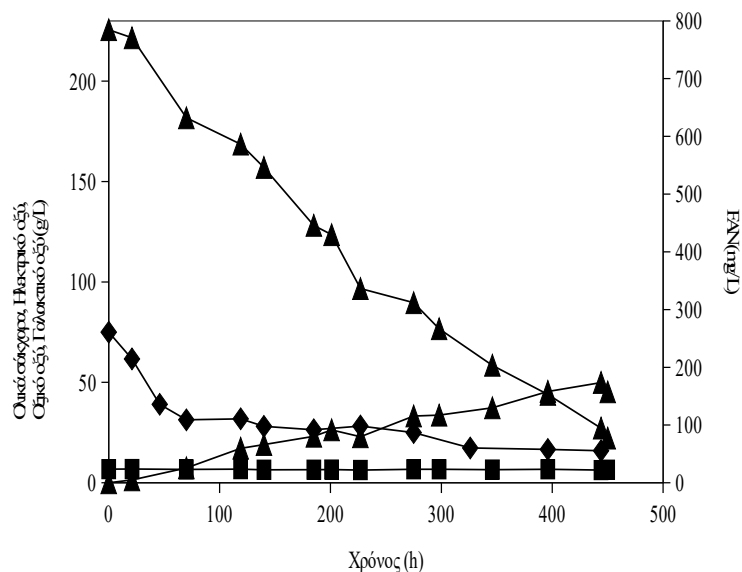
Διάγραμμα 14 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (\blacktriangle), οξικό οξύ (\circ), Γαλακτικό οξύ (\square) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (\diamond) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση υδρολύματος 70 g/L.

Με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 100g/L, (Διάγραμμα 15) η ζύμωση διήρκησε 267 ώρες με τη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος να είναι 34,43g/L και συνολικά μη καταναλωθέντα σάκχαρα 17g/L. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε 0,35 g/g και μέγιστη παραγωγικότητα 0,13g/L/h. Η αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος 3,3g/L στο μέσο καλλιέργειας αυξήθηκε με μέγιστη συγκέντρωση 9g/L περίπου στις 151 ώρες, και στη συνέχεια καταναλώθηκε πλήρως. Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στο μέσο της ζύμωσης παρέμεινε σταθερή μέχρι το τέλος.



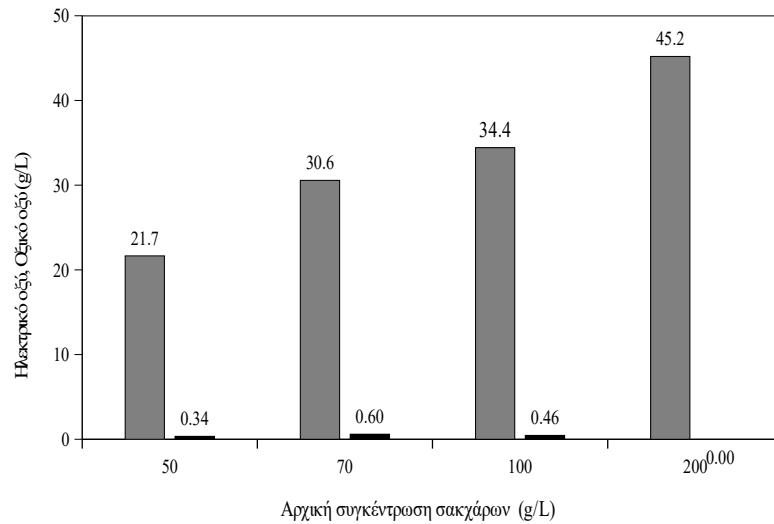
Διάγραμμα 15 Ηλεκτρικό οξύ (○), Ολικά σάκχαρα (◇), οξιμό οξύ (△), Γαλακτικό οξύ (□) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση υδρολύματος 100 g/L.

Με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 200g/L, (Διάγραμμα 16) η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 450 ώρες με μέγιστη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος 45g/L και συνολικά μη καταναλωθέντα σάκχαρα 22,2g/L. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε 0,20 g ηλεκτρικού οξέος/g σακχάρων και μέγιστη παραγωγικότητα 0,10 g/L ηλεκτρικού οξέος/h. Τα εναπομείναντα σάκχαρα προέκυψαν από την πλήρη κατανάλωση της γλυκόζης, ως κύρια πηγή άνθρακα, και τη μη κατανάλωση των υπολοίπων σακχάρων από τον μικροοργανισμό. Επίσης, στο υγρό καλλιέργειας η μέγιστη συγκέντρωση του οξικού οξέος έφτασε μόλις στα 5,5g/L περίπου στις 70 ώρες. Η συγκέντρωση αυτή είναι αρκετά μικρότερη σε σύγκριση με τις προηγούμενες συγκεντρώσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων δρά παρεμποδιστικά στην παραγωγή του οξικού οξέος. Ωστόσο προς το τέλος της ζύμωσης το οξιμό έχει καταναλωθεί πλήρως ως επιπλέον πηγή άνθρακα. Τέλος, η αρχική παρουσία και η σταθερή συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (περίπου 24 g/L) στο υδρόλυμα δεν υποδηλώνει μικροβιακή μόλυνση του υποστρώματος καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης.

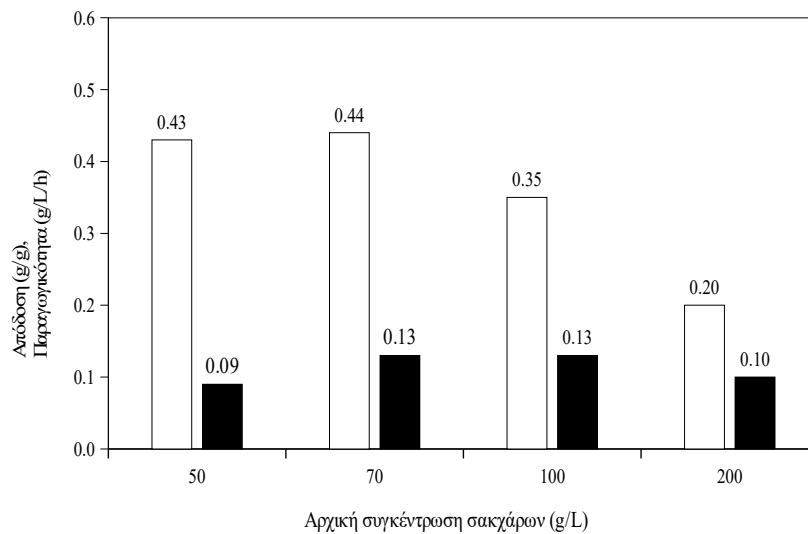


Διάγραμμα 16 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), Ολικά σάκχαρα (▲), οξικό οξύ (○), Γαλακτικό οξύ (□) και άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και των αμινοξέων (FAN) (◇) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση υδρολύματος 200 g/L.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 17 είναι φανερό ότι η συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος αυξάνεται όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 17 η τελική συγκέντρωση οξικού οξέος είναι σχεδόν μηδενική σε όλες τις περιπτώσεις στο τέλος της ζύμωσης. Αντίστοιχα, η απόδοση του παραγόμενου ηλεκτρικού οξέος λαμβάνει μέγιστη τιμή 0,44 g/g όταν η αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα είναι 70 g/L (Διάγραμμα 18). Οι υψηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα είχαν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης. Παράλληλα, η παραγωγικότητα εμφανίζει υψηλή τιμή (0,13 g/L/h) στις αρχικές συγκεντρώσεις 70 g/L και 100 g/L, ενώ στα 50 g/L και 200 g/L είναι μειωμένη.



Διάγραμμα 17 Ηλεκτρικό οξύ (g/L) (■) και Οξικό οξύ (g/L) (■) με τη χρήση υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων.



Διάγραμμα 18 Συντελεστής απόδοσης g/g (□) και παραγωγικότητα g/L/h (■) με τη χρήση υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων.

Τέλος, κατά τη σύγκριση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες με τη χρήση εμπορικών σακχάρων σε συνθετικό υπόστρωμα και τη χρήση υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου (Πίνακας 3) η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος αυξήθηκε με τη χρήση του υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως υπόστρωμα. Παράλληλα η συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν σημαντικά χαμηλότερη όταν χρησιμοποιήθηκε το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων ως υπόστρωμα. Σύμφωνα με την πορεία του γλυοξιλικού, πιθανόν, το οξικό οξύ καταναλώνεται από τον μικροοργανισμό μετατρέποντας το πρώτα σε ακετυλο-CoA, σύμφωνα με την αντίδραση που ωθείται από το ενεργειακό μόριο ATP και καταλύεται από τη συνθετάση του ακετυλο-CoA:



Η υψηλότερη τιμή απόδοσης μεταξύ των δύο υποστρωμάτων σημειώθηκε στην αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 70 g/L με το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων ως υπόστρωμα (0,44 g/g). Αντίθετα, η παραγωγικότητα χρησιμοποιώντας το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων ως υπόστρωμα ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με το συνθετικό υπόστρωμα. Συνεπώς, το υδρόλυμα που προκύπτει από τα στερεά αστικά απόβλητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μικροβιακές ζυμώσεις με την χρήση της ζύμης *Yarrowia lipolytica* PSA02004 προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.

Πίνακας 3 Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα στη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος

Υπόστρωμα	Αρχική συγκέντρωση σακχάρων (g/L)	Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	Οξικό οξύ (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/L/h)
Συνθετικό υπόστρωμα	30	10,68	6,95	10,17	0,36	0,17
	50	14,33	6,55	13,47	0,29	0,15
	70	22,20	4,05	16,60	0,33	0,17
	100	35,02	1,40	18,43	0,32	0,19
	150	46,22	0,34	27,93	0,33	0,18
	200	49,59	0,00	29,90	0,24	0,14
Υδρόλυμα αστικών αποβλήτων	50	21,65	0,34	-	0,43	0,09
	70	30,56	0,60	-	0,44	0,13
	100	34,43	0,46	-	0,35	0,13
	200	45,24	0,00	-	0,20	0,10

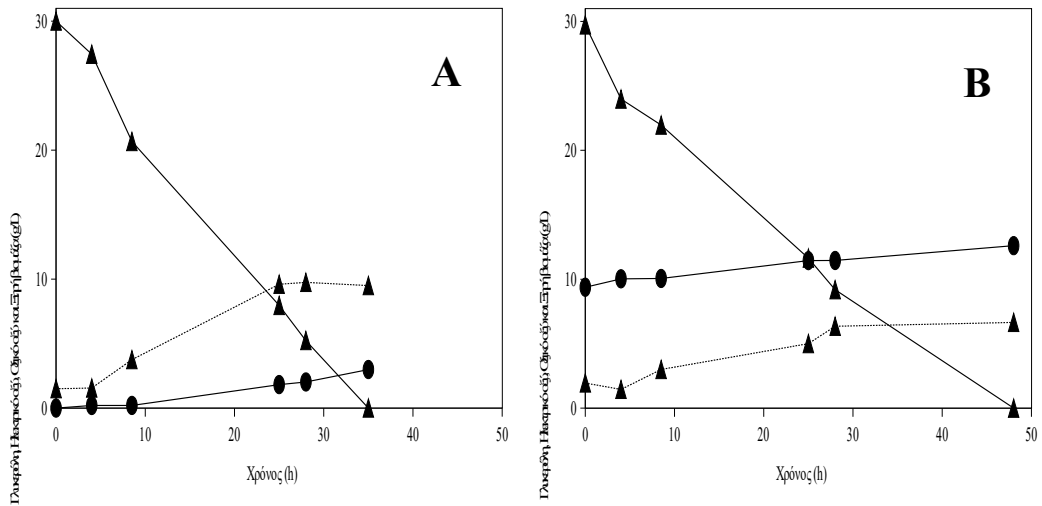
3.3 Μελέτη κατανάλωσης οξικού οξέος

3.3.1 Ασυνεχείς ζυμώσεις

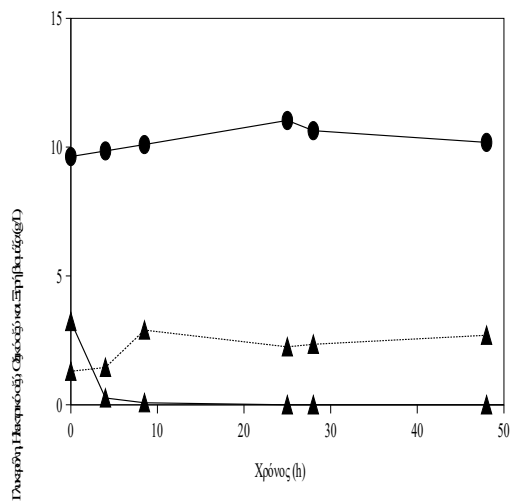
Μια σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με σκοπό να ερευνηθεί η κατανάλωση οξικού οξέος προς παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος με το συγκεκριμένο μικροοργανισμό.

Αρχικά ως μάρτυρας πραγματοποιήθηκε ζύμωση με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L και χωρίς προσθήκη οξικού οξέος. Στη περίπτωση αυτή η παραγωγή του ηλεκτρικού και οξικού οξέος έφτασε στα 5,9 g/L και 3 g/L, αντίστοιχα με απόδοση 0,20 g/g και παραγωγικότητα 0,17 g/L/h. Η τελική συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 9,5 g/L. (Διάγραμμα 19^Α). Στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση 30 g/L γλυκερόλης και αρχική συγκέντρωση 10 g/L οξικού οξέος η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος ήταν 6,4 g/L με απόδοση και παραγωγικότητα 0,16 g/g και 0,13 g/L/h, αντίστοιχα. Σε αυτή τη περίπτωση η τελική συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν 12,6 g/L από τα οποία μόνο τα 3,2 είχαν παραχθεί, χωρίς να καταναλωθεί κάποια ποσότητα από αυτό. Η συγκέντρωση της βιομάζας σε αυτή τη περίπτωση ήταν

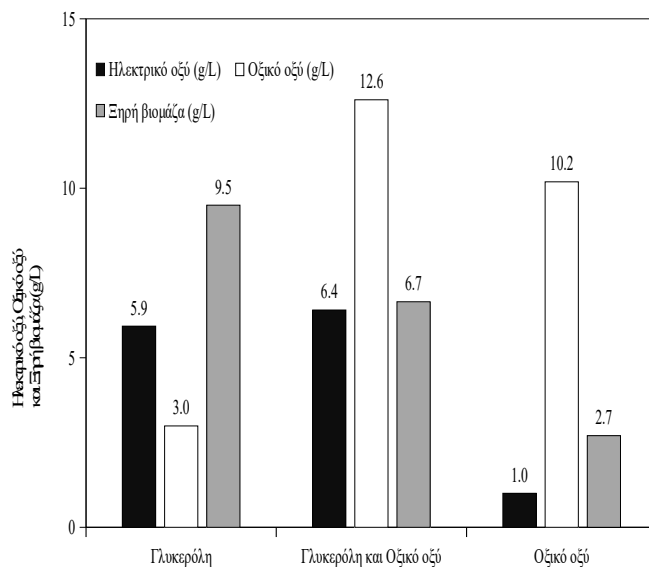
χαμηλότερη (6,7 g/L) (Διάγραμμα 19^B). Όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα με αρχική συγκέντρωση 10 g/L, η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος και η ανάπτυξη του μικροοργανισμού ήταν σημαντικά μειωμένη, ίση με 1,0 g/L και 2,7 g/L βιομάζας αντίστοιχα. Γίνεται αντιληπτό ότι η παραγόμενη ποσότητα ηλεκτρικού οξέος οφείλεται στη παρουσία γλυκερόλης (περίπου 3 g/L), η οποία προέρχεται από την προσθήκη του εμβολίου. Ωστόσο, κατά την διάρκεια της ζύμωσης, το οξικό οξύ δεν φαίνεται να καταναλώνεται. Ανάπτυξη του μικροοργανισμού και παραγωγή ηλεκτρικού οξέος παρατηρείται στις 10 πρώτες ώρες της ζύμωσης και στη συνέχεια παραμένουν σταθερά (Διάγραμμα 19^Γ). Σύμφωνα με τα πιο πάνω πειραματικά αποτελέσματα παρατηρείται ότι η παρουσία οξικού οξέος επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (μικρότερη παραγωγή βιομάζας) και επομένως την παραγωγικότητα της ζύμωσης (Διάγραμμα 20, 21). Επιπλέον, παρατηρείται ότι με χαμηλή αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (30g/L), το παραγόμενο οξικό οξύ δεν καταναλώνεται από το μικροοργανισμό ως εναλλακτική πηγή άνθρακα, μετά από την πλήρη κατανάλωση της γλυκερόλης. Τέλος, το οξικό οξύ ως η μόνη πηγή άνθρακα δεν μπορεί να καταναλωθεί από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό.



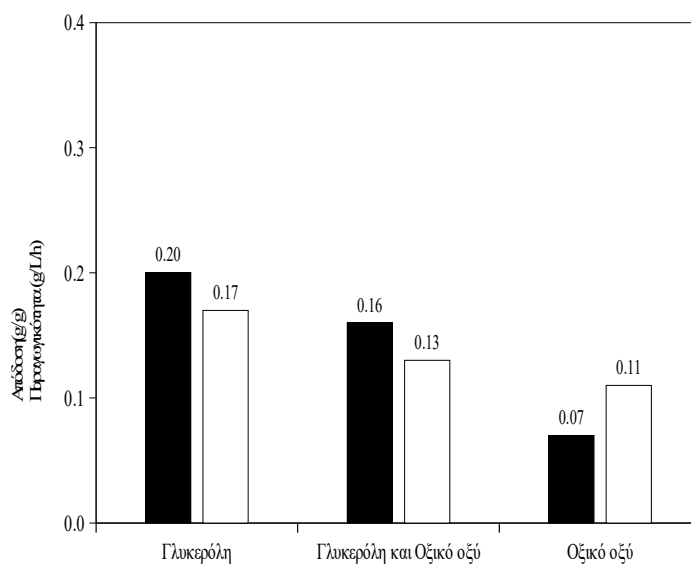
Γ



Διάγραμμα 19 Ηλεκτρικό οξύ (Δ), γλυκερόλη (▲), οξικό οξύ (●), και ξηρή βιομάζα (-▲-) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης.



Διάγραμμα 20 Ηλεκτρικό οξύ (g/L) (■), Οξικό οξύ (g/L) (□) και βιομάζα g/L (▒) σε ασυνεχείς ζυμώσεις μελέτης κατανάλωσης οξικού οξέος



Διάγραμμα 21 Συντελεστής απόδοσης g/g (■) και παραγωγικότητα g/L/h (▒) σε ασυνεχείς ζυμώσεις μελέτης κατανάλωσης οξικού οξέος

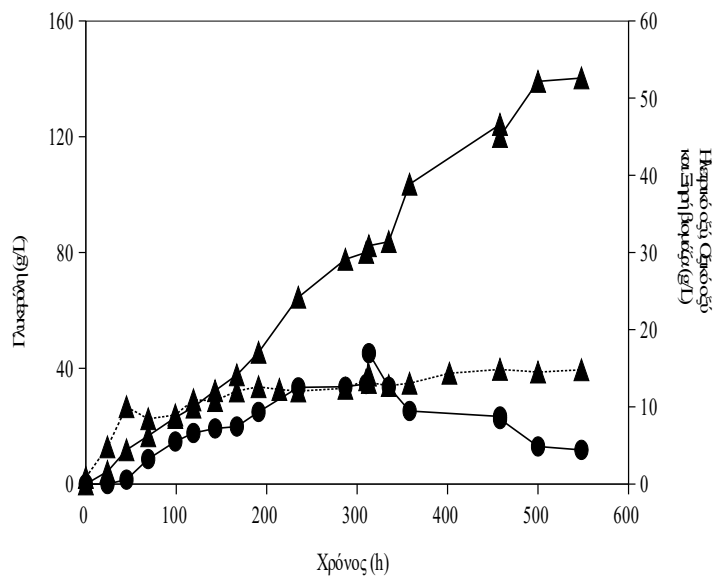
3.3.2 Ημι-συνεχείς ζυμώσεις

Με σκοπό την αύξηση της παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος και τη περαιτέρω μελέτη κατανάλωσης του οξικού οξέος από το μικροοργανισμό πραγματοποιήθηκαν ημι-συνεχείς ζυμώσεις με δύο διαφορετικές πηγές άνθρακα (γλυκερόλης και μίγμα εμπορικών σακχάρων, ίδιας σύστασης με του υδρολύματος αστικών αποβλήτων) με μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση 150 g/L με αρχική προσθήκη και χωρίς προσθήκη οξικού οξέος.

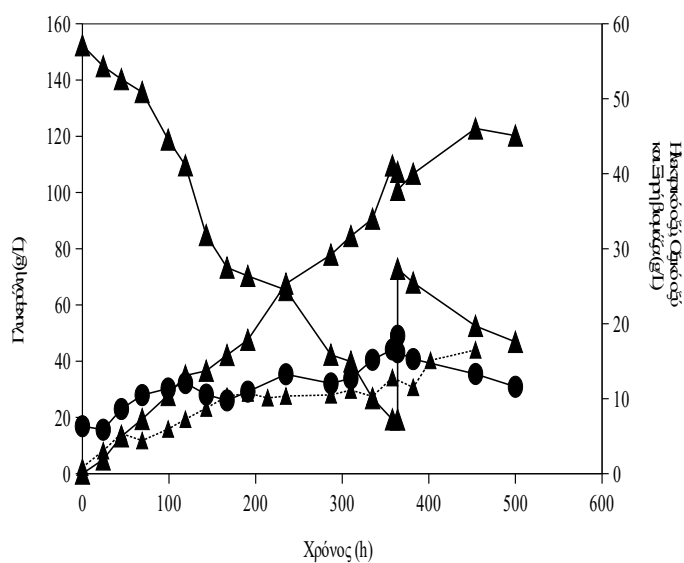
Στο διάγραμμα 22 παρουσιάζεται το προφίλ της ζύμωσης ως προς τη κατανάλωση της γλυκερόλης και τη παραγωγή του ηλεκτρικού και οξικού οξέος από την ζύμη *Yarrowia lipolytica* PSA02004 χωρίς αρχική προσθήκη οξικού οξέος στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν περίπου 500 ώρες και συνολικά καταναλώθηκαν 179,6 g/L γλυκερόλης και παρήχθησαν 52,17 g/L ηλεκτρικού οξέος με τιμή απόδοσης 0,29 g/g. Η παραγωγικότητα της ζύμωσης στις 500 ώρες ήταν 0,10 g/L/h. Το οξικό οξύ παράγεται στη ζύμωση μέχρι τις 300 ώρες όπου η συγκέντρωση φτάνει στα 13 g/L και στη συνέχεια καταναλώνεται με τελική συγκέντρωση οξικού οξέος να είναι ίση με 4,9 g/L. Αυτό υποδηλώνει ότι το οξικό σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε στη ζύμωση ως εναλλακτική πηγή άνθρακα από τον μικροοργανισμό. Στο τέλος της ζύμωσης η παραγωγή της βιομάζας ήταν 14,85g/L και στην συνέχεια παρέμεινε σταθερή.

Αντίστοιχη ζύμωση με χρήση γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα πραγματοποιήθηκε με αρχική προσθήκη οξικού οξέος (Διάγραμμα 23). Στη περίπτωση αυτή, συνολικά καταναλώθηκαν 173,4 g/L γλυκερόλης και η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος ήταν χαμηλότερη ίση με 46,03 g/L και η τελική συγκέντρωση οξικού οξέος ίση με 13,29 g/L με απόδοση και παραγωγικότητα 0,30 g/g και 0,10 g/L/h αντίστοιχα. Στη περίπτωση αυτή η κατανάλωση του οξικού οξέος ξεκίνησε περίπου στις 400 ώρες της ζύμωσης. Στο τέλος της ζύμωσης η παραγωγή της βιομάζας ήταν 16,5g/L και στην συνέχεια παρέμεινε σταθερή.

Και στις δύο περιπτώσεις όταν η συγκέντρωση των σακχάρων μειωνόταν στα 30 g/L και το οξικό οξύ καταναλωνόταν γινόταν τροφοδοσία με πυκνό διάλυμα σακχάρων και οξικού οξέος.



Διάγραμμα 22 Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Δ), βιομάζας (-▲-), οξικού οξέος (●) και κατανάλωση γλυκερόλης (▲) κατά την ημισυνεχή ζύμωση με γλυκερόλη χωρίς αρχική προσθήκη οξικού οξέος

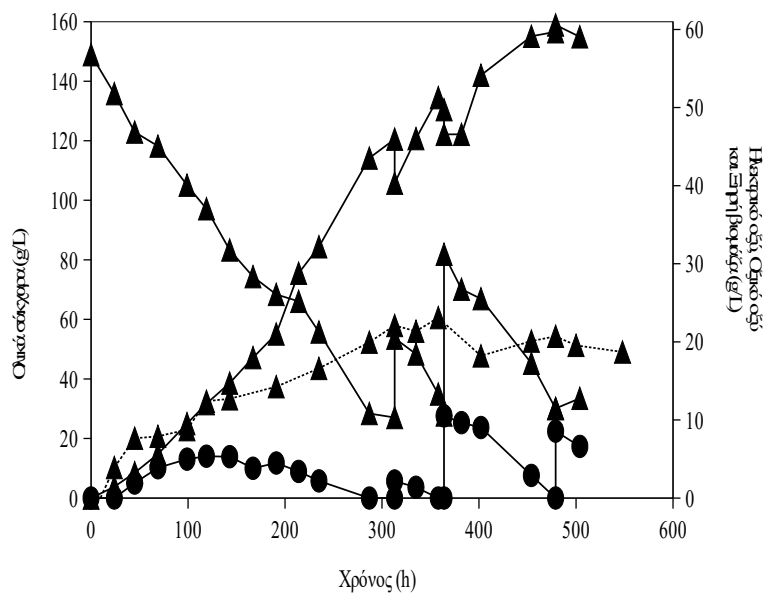


Διάγραμμα 23 Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Δ), βιομάζας (-▲-), οξικού οξέος (●) και κατανάλωση γλυκερόλης (▲) κατά την ημισυνεχή ζύμωση με γλυκερόλη με αρχική προσθήκη οξικού οξέος

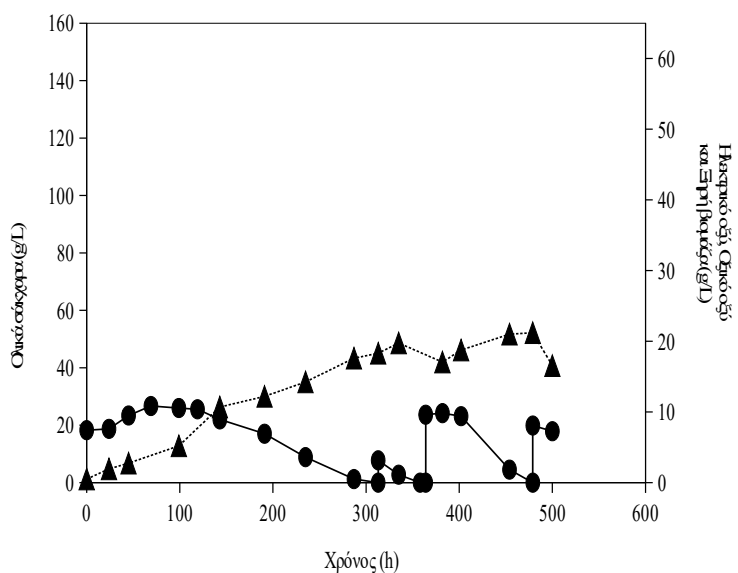
Λαμβάνοντας υπόψιν τα πιο πάνω αποτελέσματα, επιλέχθηκε να μελετηθεί η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος χρησιμοποιώντας μείγμα εμπορικών σακχάρων ως πηγή άνθρακα, ίδιας σύστασης με αυτής του υδρολύματος με αρχική συγκέντρωση 150 g/L. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν ημισυνεχείς ζυμώσεις με αρχική προσθήκη οξικού οξέος με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση του στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 24 η τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 59,12 g/L με παραγωγικότητα και απόδοση 0,12 g/L/h και 0,30 g/g αντίστοιχα. Επίσης, συνολικά καταναλώθηκαν 184,27g/L εμπορικά σάκχαρα και η παραγωγή οξικού οξέος έφτασε 5,36 g/L στις 119 ώρες ζύμωσης, ενώ στην συνέχεια καταναλώθηκε πλήρως. Όταν η συγκέντρωση των σακχάρων μειωνόταν στα 30 g/L και το οξικό οξύ καταναλωνόταν γινόταν τροφοδοσία με πυκνό διάλυμα σακχάρων και οξικού οξέος. Συνολικά καταναλώθηκαν 15,8 g/L οξικού οξέος. Συμπεραίνουμε ότι ο μικροοργανισμός χρησιμοποίησε το οξικό στη ζύμωση ως εναλλακτική πηγή άνθρακα. Η παραγωγή της βιομάζας έφτασε 20,1g/L και στην συνέχεια παρέμεινε σταθερή, γεγονός που υποδηλώνει την μη περαιτέρω αύξηση του μικροοργανισμού.

Τέλος, μελετήθηκε η αρχική προσθήκη ποσότητας οξικού οξέος στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης (Διάγραμμα 25). Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 454 ώρες με παραγωγή 60,51 g/L ηλεκτρικού οξέος με απόδοση 0,35 g/g και παραγωγικότητα 0,13 g/L/h. Επίσης, η παραγωγή οξικού οξέος στις 69 ώρες ζύμωσης ήταν 10,8 g/L από τα οποία 7,4 g/L είχαν προστεθεί στην αρχή της ζύμωσης. Επομένως παρήχθησαν μόνο 3,4 g/L οξικού οξέος, ενώ στην συνέχεια καταναλώθηκε πλήρως. Συνολικά καταναλώθηκαν 174,87g/L εμπορικά σάκχαρα. Γινόταν εκ νέου τροφοδοσία με πυκνό διάλυμα οξικού οξέος, το οποίο καταναλωνόταν με τη συγκέντρωση του οξικού οξέος στο τέλος της ζύμωσης να είναι 1,85 g/L (καταναλώθηκαν 13,5g/L οξικό οξύ). Η παραγωγή της βιομάζας έφτασε 21 g/L και στην συνέχεια παρέμεινε σταθερή, γεγονός που υποδηλώνει την μη περαιτέρω αύξηση του μικροοργανισμού. (Πίνακας 4).



Διάγραμμα 24 Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Δ), βιομάζας (-▲-), οξικού οξέος (○) και κατανάλωση σακχάρων (▲) κατά την ημισυνεχή ζύμωση χωρίς αρχική προσθήκη οξικού οξέος



Διάγραμμα 25 Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Δ), βιομάζας (-▲-), οξικού οξέος (○) και κατανάλωση σακχάρων (▲) κατά την ημισυνεχή ζύμωση με αρχική προσθήκη οξικού οξέος

Πίνακας 4 Βιοτεχνολογική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος σε ημι-
συνεχείς ζυμώσεις

	Βιομάζα (g/L)	Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	Οξικό οξύ (g/L)	Απόδοση καταναλωθέντα σάκχαρα (g/g)	Απόδοση καταναλωθέντα σάκχαρα και οξικό οξύ (g/g)	Παραγωγικότητα (g/L/h)
Γλυκερόλη	14,85	52,17	4,87	0,29	0,27	0,10
Γλυκερόλη και Οξικό οξύ	16,50	46,03	13,29	0,30	0,26	0,10
Μίγμα εμπορικών σακχάρων	20,10	59,12	5,35	0,30	0,29	0,12
Μίγμα εμπορικών σακχάρων και Οξικό οξύ	21,00	60,51	1,85	0,35	0,32	0,13

4 Συζήτηση

Η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας για την επιστήμη της βιοτεχνολογίας με ισχυρές προοπτικές ανάπτυξης. Παρατηρούμε ότι τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί το ερευνητικό ενδιαφέρον σε μεγάλο βαθμό προς τη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος χρησιμοποιώντας διάφορους μικροοργανισμούς και αξιοποιώντας διάφορα ανανεώσιμα υποστρώματα. Η αξιοποίηση των συγκεκριμένων υποστρωμάτων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους στη διαδικασία παραγωγής, σε αντίθεση με τις μεθόδους που εφαρμόζονται στη πετροχημική βιομηχανία. Λαμβάνοντας υπόψη το συνεχές αυξανόμενο κόστος το οποίο συνδέεται άμεσα με τη παροχή ενέργειας και τη διαχείριση των αποβλήτων, η αξιοποίηση του οργανικού κλάσματος αστικών στερεών αποβλήτων αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον πρακτική. Η πλούσια περιεκτικότητα σε οργανικές ενώσεις και το χαμηλό κόστος τη καθιστούν ιδανική πρώτη ύλη για τη παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας συμπεριλαμβανομένου του ηλεκτρικού οξέος. Παρ' όλα αυτά η βελτιστοποίηση της διεργασίας παραγωγής ηλεκτρικού οξέος χρειάζεται περισσότερη έρευνα με σκοπό να επιτευχθεί μια οικονομικά εφικτή και αποδοτική διεργασία.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης εξετάστηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης πηγής άνθρακα με εμπορικά σάκχαρα και με τη χρήση του υδρολύματος αστικών αποβλήτων. Επίσης μελετήθηκε η κατανάλωση του οξικού οξέος από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό σε ασυνεχείς και ημι-συνεχείς ζυμώσεις.

Από τα πειραματικά αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η ζύμη *Yarrowia lipolytica* PSA02004 είναι ανθεκτική στις υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και μπορεί να αναπτυχθεί και να παραχθεί ηλεκτρικό οξύ σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις. Η χρήση του υδρολύματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα και αζώτου αύξησε τη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος, ενώ παράλληλα η συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν σημαντικά χαμηλότερη όταν χρησιμοποιήθηκε το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων ως υπόστρωμα. Σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με χρήση της ζύμης *Yarrowia lipolytica* PSA02004 με τη χρήση συνθετικού υποστρώματος προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος παρήχθη ποσότητα οξικού οξέος σε χαμηλή

συγκέντρωση, ενώ στη συνέχεια, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100g/L ολικών σακχάρων καταναλώθηκε πλήρως από τον μικροοργανισμό μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Αντίθετα, χρησιμοποιώντας το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων η τελική ποσότητα του οξικού οξέος στο τέλος της ζύμωσης ήταν μικρότερη από 1 g/L σε όλες τις περιπτώσεις. Η υψηλότερη τιμή απόδοσης μεταξύ των δύο υποστρωμάτων σημειώθηκε στην αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 70 g/L με το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων ως υπόστρωμα (0,44 g/g). Αντίθετα, η παραγωγικότητα χρησιμοποιώντας το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων ως υπόστρωμα ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με το συνθετικό υπόστρωμα. Συνεπώς, το υδρόλυμα που προκύπτει από τα στερεά αστικά απόβλητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μικροβιακές ζυμώσεις με την χρήση της ζύμης *Yarrowia lipolytica* PSA02004 προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Μια σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με σκοπό να ερευνηθεί η κατανάλωση οξικού οξέος προς παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος με το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Επίσης, με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα των ασυνεχών ζυμώσεων συμπεραίνεται ότι η παρουσία οξικού οξέος σε γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 30 g/L ως πηγή άνθρακα επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και επομένως τη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος. Το οξικό οξύ ως η μόνη πηγή άνθρακα δεν καταναλώνεται από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Επιπλέον, στις ημι-συνεχείς ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση 150 g/L με αρχική προσθήκη και χωρίς προσθήκη οξικού οξέος η ανάπτυξη του μικροοργανισμού και παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος δεν επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό. Μεγαλύτερη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (60 g/L) και βιομάζας και χαμηλότερη τελική συγκέντρωση οξικού οξέος παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας το μείγμα εμπορικών σακχάρων έναντι της γλυκερόλης. Επίσης, η προσθήκη πυκνού διαλύματος οξικού οξέος καταναλωνόταν από το μικροοργανισμό.

Συγκρίνοντας τα πιο πάνω πειραματικά αποτελέσματα με τη βιβλιογραφία, παρατηρούμε αντίστοιχα αποτελέσματα αλλά και σε κάποιες περιπτώσεις η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος είναι μεγαλύτερη στη παρούσα μελέτη. Στο πίνακα 5 παρουσιάζονται μερικά αποτελέσματα από τη παρούσα μελέτη αλλά και αποτελέσματα διάφορων μελετών για τη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα.

Η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης (20-100 g/L) στη κυτταρική ανάπτυξη και παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος μελετήθηκε επίσης από τους Ong et al., χρησιμοποιώντας υδρόλυμα ζαχαροκάλαμου (Ong et al., 2019). Η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος, απόδοση και παραγωγικότητα αυξανόταν όταν η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν από 20-40 g/L. Παρ' όλα αυτά με περαιτέρω αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης 60-100 g/L η παραγωγικότητα και απόδοση μειώθηκαν. Με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 40 g/L η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος έφτασε στα 14,20 g/L με απόδοση 0,50 g/g και παραγωγικότητα 0,15 g/L/h. Στην μελέτη των Li et al., η χρήση υδρολύματος από απόβλητα τροφίμων, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 60 g/L, η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος έφτασε 17,8 g/L με απόδοση και παραγωγικότητα 0,48 g/g και 0,19 g/L/h, αντίστοιχα. Η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος που παρατηρήθηκε στη παρούσα μελέτη ήταν υψηλότερη, ίση με 30,56 g/L, χρησιμοποιώντας το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων (70 g/L). Η επίδραση των αρχικών συγκεντρώσεων γλυκόζης (25-150 g/L) στην κυτταρική ανάπτυξη και τη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος από το στέλεχος ζύμης *Y. lipolytica* PSA3.0 μελετήθηκε από τους Li et al., 2018. Η συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος αυξανόταν από 6,9 g/L σε 18,9 g/L όταν η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης αυξήθηκε από 25-75 g/L. Αυξάνοντας περαιτέρω την αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (150 g/L) οδήγησε στη μείωση της παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος και παραγωγικότητας, ενώ η παραγωγή της βιομάζας αυξήθηκε από 19,9 g/L σε 49,5 g/L. Με βάση αυτό συμπεραίνεται ότι η υψηλότερη αρχική συγκέντρωση γλυκόζης οδηγεί σε υψηλή παραγωγή βιομάζας, επομένως εύρος γλυκόζης μεταξύ 50-75 g/L είναι ιδανικό για την ισορροπία μεταξύ παραγωγής βιομάζας και ηλεκτρικού οξέος (Li et al., 2018). Οι Li et al., πραγματοποίησαν μια σειρά πειραμάτων με χρήση υδρολύματος από απόβλητα φρούτων και λαχανικών. Από αρχική συγκέντρωση σακχάρων 40 g/L (32 g/L γλυκόζη και 8 g/L φρουκτόζη) και αρχική συγκέντρωση FAN 220 mg/L παρήχθησαν 2,3 g/L ηλεκτρικό οξύ και μικρή ποσότητα οξικού οξέος (2 g/L). Η μη κατανάλωση μεγάλης ποσότητας του υποστρώματος πιθανό να οφείλεται σε πιθανή ύπαρξη παρεμποδιστών στο υδρόλυμα που είχε παραχθεί (Li et al., 2018), φαινόμενο που δεν έχει παρατηρηθεί στη συγκεκριμένη μελέτη με τη χρήση του υδρολύματος αστικών αποβλήτων.

Μικροοργανισμός	Είδος καλλιέργειας	Πηγή άνθρακα	Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Πηγή
<i>Y. lipolytica</i> PSA02004	Ασυνεχής ζύμωση, Κωνικές φιάλες	70 g/L Μείγμα σακχάρων	22,2	0,33	0,17	Παρούσα μελέτη
<i>Y. lipolytica</i> PSA02004	Ασυνεχής ζύμωση, Βιοαντιδραστήρας	65 g/L Μείγμα σακχάρων, 70 % Γλυκόζη, 30% Ξυλόζη	28,2	0,55	0,36	Ong et al., 2019
<i>Y. lipolytica</i> PSA3.0	Ασυνεχής ζύμωση, Βιοαντιδραστήρας	75 g/L Συνθετικό υπόστρωμα (YPD medium)	18,4	0,23	0,53	Li et al., 2018
<i>Y. lipolytica</i> PGC202	Ασυνεχής ζύμωση, Κωνικές φιάλες	60 g/L Γλυκερόλη	18,1	0,42	0,19	Li et al., 2019
<i>Y. lipolytica</i> PGC202	Ασυνεχής ζύμωση, Κωνικές φιάλες	60 g/L Γλυκόζη	17,6	0,43	0,18	Li et al., 2019
<i>Y. lipolytica</i> PSA02004	Ασυνεχής ζύμωση, Κωνικές φιάλες	70 g/L Υδρόλυμα αστικών αποβλήτων	30,56	0,44	0,13	Παρούσα μελέτη
<i>Y. lipolytica</i> PGC202	Ασυνεχής ζύμωση, Κωνικές φιάλες	60 g/L Υδρόλυμα από απόβλητα τροφίμων	17,8	0,48	0,19	Li et al., 2019
<i>Y. lipolytica</i> PSA02004	Ασυνεχής ζύμωση, Βιοαντιδραστήρας	130 g/L Υδρόλυμα από απόβλητα τροφίμων	65,8	0,50	0,69	Yang et al., 2019
<i>Y. lipolytica</i> PSA02004	Ασυνεχής ζύμωση, Κωνικές φιάλες	40 g/L Ζαχαροκάλαμο, 70 % Γλυκόζη, 30% Ξυλόζη (Sugarcane bagasse)	14,20	0,50	0,15	Ong et al., 2019
<i>Y. lipolytica</i> PSA02004	Ασυνεχής ζύμωση, Βιοαντιδραστήρας	67.5 g/L Ζαχαροκάλαμο, 70 % Γλυκόζη, 30% Ξυλόζη (Sugarcane bagasse)	33,20	0,58	0,33	Ong et al., 2019

Πίνακας 5 Βιοτεχνολογική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος

5 Βιβλιογραφία

- Ahmed I, Morris D , 1994, Replacing petrochemical with biochemicals. Institute for Local Self Reliance, Washington, DC
- Bankar, A.V., Kumar, A.R. & Zinjarde, S.S. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2009, 84: 847
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., & Stryer, L. , 2002, *Biochemistry*. New York, W.H. Freeman.
- Cao Y., Zhang R., Sun C., Cheng T., Liu Y., Xian M., 2013, Fermentative Succinate Production: An Emerging Technology to Replace the Traditional Petrochemical Processes. *BioMed Research International* Volume 2013
- Cheng K., Zhao X.B., Zeng J., Z.J.A., 2012, Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6 (3), 246-256
- Cecchini G, 2003, Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem.* 72:77–109
- Davis CP, Cleven D, Brown J, Balish E ,1976, *Anaerobio spirillum*, a new genus of spiral shaped bacteria. *Int J SystBacteriol* 26, 498-504
- European Environment Agency, 2015, Waste — municipal solid waste generation and management, (Figure 1),1–4.
- Guettler Michael V., Denise Rumler and Mahendra K. Jain , 1999 , *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic.acid producing strain from the bovin rumen *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 207-216
- Kumar, R., Singh, S. and Singh, O. V.,2008, Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35,377–391.
- Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong, S.H., Chang, H.N., 2002, Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 663-668.

- Li C., Yang X., Gao S., Wang H., Lin C. S. K., 2017, High efficiency succinic acid production from glycerol via in situ fibrous bed bioreactor with an engineered *Yarrowia lipolytica*, *Bioresour. Technol.*, 225, 9-16
- Li C., Yang X., Gao S., Chum A. H., Lin C.S.K.,2018, Hydrolysis of fruit and vegetable waste for efficient succinic acid production with engineered *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Cleaner Production*. Elsevier Ltd, 179, 151–159.
- Lin C.S.K., Du C.Y., Koutinas A., Wang R., Webb C., 2008, Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*, *Biochem. Eng. J.* 41, 128-135.
- Morgunov I.G., Kamzolova S.V. & Lunina J.N., 2013, The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation, *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 7387–7397
- Gao C., Yang X., Wang H., Rivero C. P., Li C, Cui Z, Qi Q., and Lin C. S. K. , 2016 , Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central, 9(1), 1–11.
- Li, C. *et al.* , 2018, ‘Efficient metabolic evolution of engineered *Yarrowia lipolytica* for succinic acid production using a glucose-based medium in an in situ fibrous bioreactor under low-pH condition’, *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central, 11(1), 236.
- Ong K. L., Li C., Li X., Zhang Y., Xu J., Lin C. S. K.,2019, Co-fermentation of glucose and xylose from sugarcane bagasse into succinic acid by *Yarrowia lipolytica*, *Biochemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 148, 108–115.
- Yang X., Wang H., Li C., and Lin C. S. K., 2017, Restoring of Glucose Metabolism of Engineered *Yarrowia lipolytica* for Succinic Acid Production via a Simple and Efficient Adaptive Evolution Strategy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(20), 4133–4139.
- Ragauskas A. J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G, Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J., Hallett J.P., Leak D.J., 2006, The Path Forward for Biofuels and Biomaterials, *Science*, 311, 484–489.

Sanchez A.M., Bennett G.N., San K.Y., 2005, Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity, *Metab. Eng.* 7, 229-239.

Wang D., Li Q.A., Song Z.Y., Zhou W., Su Z.G., Xing J.M., 2011, High cell density fermentation via a metabolically engineered *Escherichia coli* for the enhanced production of succinic acid, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 512-518.

Wijngaard H.H., Roble C., Brunton N., 2009, A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants, *Food Chem.* 116, 202–207

Willke T. and Vorlop K. D., 2004, Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66,131–142.

World Farmers Organization, 2014 <http://www.wfo-oma.com/news/global-production-of-fruits-and-vegetables-increased-by-9-4.html>.

Yang X.F., Wang H.M., LI C., Lin C.S.K., 2017, A simple and efficiency adaptive evolution strategy for restoring of glucose metabolism of succinic acid producing *Yarrowia lipolytica* mutant, *J. Agric. Food Chem.* 60, 4133-4139.

Zeikus J. G., Jain M. K., P. Elankovan , 1999, Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products, *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 545-552

Ανδρεαδάκης Α., Πανταζίδου Μ., Σταθόπουλος Α., 2008, Περιβαλλοντική Τεχνολογία, Εκδόσεις Συμμετρία.

Μακρή Ευτυχία, 2017, πτυχιακή εργασία με τίτλο “Ανάπτυξη βιοδιεργασίας παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και βιοαιθανόλης απο απόβλητα παρασκευής χυμών πορτοκαλιού”, Λεμεσός.

