



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &**  
**ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ – ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Βιοτεχνολογική αξιοποίηση του τυρογάλακτος προς παραγωγή  
κυτταρικής βιομάζας και μεταβολιτών με τη χρήση ζυμών



**Βασιλάκης Ι. Γαβριήλ**  
**Βιολόγος B.Sc., Ε.Κ.Π.Α.**

Επιβλέπων καθηγητής:  
Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ, 2021**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Βιοτεχνολογική αξιοποίηση του τυρογάλακτος προς παραγωγή  
κυτταρικής βιομάζας και μεταβολιτών με τη χρήση ζυμών

“Biotechnological valorization of cheese whey by oleaginous yeasts for  
production of cell biomass and metabolites”

**Βασιλάκης Γαβριήλ**  
**Βιολόγος B.Sc., Ε.Κ.Π.Α.**

Εξεταστική επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ιωάννης Πολίτης, Καθηγητής ΓΠΑ

Θεόφιλος Μασούρας, Καθηγητής ΓΠΑ

## Βιοτεχνολογική αξιοποίηση του τυρογάλακτος προς παραγωγή κυτταρικής βιομάζας και μεταβολιτών με τη χρήση ζυμών

Π.Μ.Σ. Σύγχρονη τεχνολογία τροφίμων – γαλακτοκομία  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ραγδαία αύξηση της παραγωγής αποβλήτων παγκοσμίως, αναγκάζει την κοινωνία και την επιστημονική κοινότητα να βρουν βιώσιμες λύσεις, μειώνοντας τον όγκο των παραγόμενων υπολειμμάτων και αξιοποιώντας τα μέσω φιλικών προς το περιβάλλον διαδικασιών. Η μείωση των αποβλήτων συνδυασμό με τη χρήση τους για την παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας ή βιοαερίου ωφελεί τόσο το περιβάλλον όσο και την οικονομία. Η βιομηχανία γαλακτοκομικών και τυροκομικών απετέλεσε ανέκαθεν βασικό πυλώνα της ελληνικής οικονομίας, με τεράστια ποικιλία, ευρέως αποδεκτών, προϊόντων. Ωστόσο, η τυροκομική πρακτική παρασκευής τυριού οδηγεί στην αποβολή του τυρογάλακτος, ενός παραπροϊόντος με πολύ υψηλό οργανικό φορτίο. Διάφοροι τρόποι μείωσης του ρυπαντικού φορτίου, όπως η αερόβια επεξεργασία, η αναερόβια χώνευση, η χρήση ως ζωοτροφή, η διήθηση για τον διαχωρισμό συμπυκνωμάτων πρωτεΐνης ορού γάλακτος και ο διαχωρισμός τους λόγω έντονης αναθέρμανσης, κροκκίδωσης των πρωτεϊνών του ορού και παρασκευής τυριών τυρογάλακτος με επακόλουθη καλλιέργεια μικροοργανισμών στο δευτερογενές τυρόγαλα, ένα ρεύμα πλούσιο σε λακτόζη, προκειμένου να παραχθούν μεταβολίτες προστιθέμενης αξίας (όπως μονοκυτταρική βιομάζα, μικροβιακά λιπίδια, οργανικά οξέα, κ.ο.κ.), έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

Η καλλιέργεια ελαιογόνων ζυμών σε αγρο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υλικά εκκίνησης της διεργασίας για τη σύνθεση «2ης γενιάς» βιοντίζελ και διάφορων τύπων ελαιοχημικών, θεωρείται ως μία από τις σημαντικότερες προσεγγίσεις της Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας, στα πλαίσια της κυκλικής πράσινης οικονομίας και της βιώσιμης ανάπτυξης. Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκαν 8 στελέχη ζύμης ως προς την ανάπτυξή τους σε καθορισμένο υπόστρωμα, με λακτόζη ως πηγή άνθρακα και πέντε από αυτά τα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε αυτό το υπόστρωμα εμβολιάστηκαν στο δευτερογενές τυρόγαλα (SCW). Όλα αυτά τα στελέχη αναπτύχθηκαν στο δευτερογενές τυρόγαλα, παράγοντας κυρίως βιομάζα, μικροβιακά λιπίδια αλλά και μεταβολίτες υψηλού ενδιαφέροντος, όπως πολυσακχαρίτες. Στο υπόστρωμα αυτό, το στέλεχος *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 παρήγαγε την υψηλότερη ολική ξηρή βιομάζα (T.D.W.) (22,7 g/L), η οποία περιείχε 3,4 g/L ενδοκυτταρικών λιπιδίων, ακολουθούμενο από το *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511, με ξηρή βιομάζα 16,9 g/L και συσσωρευμένα λιπίδια 2,3 g/L. Ένα νέο, μη εκτεταμένο μελετημένο στέλεχος, το *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536, παρήγαγε σημαντική ποσότητα T.D.W. (20,4 g/L), κυρίως λόγω έκκρισης εξωπολυσακχαριτών στην εξοκυτταρική κάψουλα, που περιβάλλει τα κύτταρα. Οι υψηλότερες παραγωγικότητες ξηρής βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους, 0,23 g/L/h και 0,04 g/L/h αντίστοιχα,

καταγράφηκαν για το στέλεχος *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. Τα κυτταρικά λιπίδια όλων των μικροοργανισμών, περιέχουν σε μεταβλητές ποσότητες τα λιπαρά οξέα  $\Delta^9$ C18:1, C16:0, C18:0 και  $\Delta^{9,12}$ C18:2, αποτελώντας ιδανικά υποστρώματα για τη σύνθεση βιοντίζελ «2ης γενιάς».

**Επιστημονική περιοχή:** Αξιοποίηση αποβλήτων βιομηχανιών τροφίμων

**Λέξεις κλειδιά:** δευτερογενές τυρόγαλα, ελαιογόνες ζύμες, μονο-κυτταρικό λίπος, μικροβιακά λιπίδια, βιοντίζελ «2ης γενιάς»

## **Biotechnological valorization of cheese whey by oleaginous yeasts for production of cell biomass and metabolites**

*MSc Food Technology – Dairy Science  
Department of Food Science & Human Nutrition  
Laboratory of Food Microbiology & Biotechnology*

### **ABSTRACT**

The rapid increase in waste generation worldwide, is forcing the scientific community and society to find sustainable solutions, primarily reducing the volume of the produced residues and, consequently, utilizing these materials under eco-friendly processes. The reduction of wastes in combination with their utilization for the production of new products of added value or biogas benefits both the environment and the economy. The dairy and cheese-making industry have always been pillars of the Greek economy, with a variety of products, widely accepted. Cheese-making practice, however, leads to the production of cheese whey, a by-product with a very high organic load. Various ways of reducing the pollutant load, such as the aerobic treatment, the anaerobic digestion, the usage as feed, the filtration to separate whey protein concentrates and lactose fractions, and the cultivation of useful microorganisms into the lactose fraction, in order to produce added-value metabolites (i.e. single-cell biomass, single-cell oil, organic acids, etc) have been reported in the literature.

The cultivation of oleaginous yeasts in various agro-industrial residues and the subsequent production of microbial lipids, which can be used as starting materials for the synthesis of both “2<sup>nd</sup> generation” biodiesel and various types of oleochemicals, is considered as one of the most important approaches of the Microbial Biotechnology, in terms of circular economy, green growth and sustainable development. In this study, 8 yeast strains were evaluated for their growth on a defined substrate, with lactose as a carbon source, and five of these strains grown on this substrate were inoculated into the complex substrate, second cheese whey. All of these strains were grown in second cheese whey, producing mainly yeast biomass, microbial lipids but also interesting metabolites such as polysaccharides. The strain *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 produced the highest total dry weight (T.D.W.) (=22.7 g/L; in second cheese whey cultivation) that contained 3.4 g/L of cellular lipids, followed by *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511, which produced 16.9 g/L of T.D.W. containing 2.3 g/L of lipids. A new, not extensively utilized in the literature, strain namely *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536, produced significant quantities of T.D.W. (20.4 g/L) and also, interestingly, secreted quantities of exopolysaccharides. The highest T.D.W. and lipid productivity, 0.23 g/L/h (one of the highest in literature) and 0.04 g/L/h respectively, were recorded for the strain *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. Cellular lipids of all microorganisms contained in variable quantities the fatty acids  $\Delta^9$ C18:1, C16:0, C18:0 and  $\Delta^{9,12}$ C18:2, constituting perfect candidates for the synthesis of 2<sup>nd</sup> generation biodiesel.

**Scientific area:** Food waste valorization

**Keywords:** second cheese whey, oleaginous yeasts, single cell oil, microbial lipids, 2<sup>nd</sup> generation biodiesel

## «ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ»

<b>1. Εισαγωγή</b> .....	<b>17</b>
1.1. Παραγωγή αποβλήτων   .....	18
1.2. Σύσταση και διάθεση αποβλήτων   .....	22
1.3. Κυκλική οικονομία – Πράσινη αειφόρα ανάπτυξη   .....	25
1.4. Η γαλακτοκομία   .....	26
1.4.1. Το γάλα.....	27
1.4.2. Η γαλακτοβιομηχανία στην Ελλάδα .....	30
1.5. Η τυροκομία   .....	34
1.5.1. Παρασκευή τυριού.....	37
1.5.2. Αξιοποίηση του πρωτογενούς τυρογάλακτος.....	42
1.5.3. Δευτερογενές τυρόγαλα.....	55
1.6. Μικροβιακό λίπος – Single Cell Oil, S.C.O.   .....	56
1.6.1. Λίπη & έλαια .....	56
1.6.2. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.....	57
1.6.3. Η βιοχημεία της συσσώρευσης λίπους.....	62
<b>2. Σκοπός της μελέτης</b> .....	<b>69</b>
<b>3. Υλικά &amp; Μέθοδοι</b> .....	<b>71</b>
3.1. Βιολογικό υλικό   .....	72
3.2. Μικροβιακή καλλιέργεια ελέγχου (control) σε λακτόζη   .....	72
3.2.1. Υπόστρωμα προκαλλιέργειας.....	72
3.2.2. Υπόστρωμα κύριας καλλιέργειας ελέγχου .....	73
3.2.3. Εμβολιασμός και συνθήκες επώασης.....	74
3.3. Μικροβιακή καλλιέργεια σε δευτερογενές τυρόγαλα   .....	75
3.4. Μέθοδοι ανάλυσης   .....	78
3.4.1. Ποσοτικός προσδιορισμός βιομάζας.....	78
3.4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός καταναλωθείσας λακτόζης.....	78
3.4.3. Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους .....	80
3.4.4. Ποιοτικός προσδιορισμός κλασμάτων λιπιδίων.....	81
3.4.5. Ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων .....	82
3.4.6. Ποσοτικός προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων.....	85
3.4.7. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης .....	87
<b>4. Αποτελέσματα</b> .....	<b>89</b>
4.1. Καλλιέργεια ελέγχου σε λακτόζη   .....	90
4.1.1. Καλλιέργεια του <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509.....	91
4.1.2. Καλλιέργεια του <i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511.....	92
4.1.4. Καλλιέργεια του <i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL YB-3594.....	94
4.1.5. Καλλιέργεια του <i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> ACA-DC 5079 .....	95
4.1.6. Καλλιέργεια των <i>Cryptococcus (Naganishia) uzbekistanensis</i> NRRL Y-44, <i>Trichosporon ovooides</i> ACA-DC 5052 και <i>Cutaneotrichosporon cutaneum</i> NRRL Y-2525 .....	96

4.1.6. Επανακαλλιέργεια του <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 .....	97
4.2. Καλλιέργεια σε δευτερογενές τυρόγαλα   .....	100
4.2.1. Καλλιέργεια του <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 .....	101
4.2.2. Καλλιέργεια του <i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511 .....	103
4.2.3. Καλλιέργεια του <i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL Y-2536 .....	105
4.2.4. Καλλιέργεια του <i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL YB-3594 .....	107
4.2.5. Καλλιέργεια του <i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> ACA-DC 5079 .....	109
4.3. Διαχωρισμός κλασμάτων μέσω Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας   .....	112
<b>5. Συζήτηση – Συμπεράσματα .....</b>	<b>113</b>
5.1. Σύνοψη   .....	114
5.2. Συγκριτική αξιολόγηση   .....	116
5.3. Συμπεράσματα   .....	124
5.4. Μελλοντικοί στόχοι   .....	126
<b>6. Βιβλιογραφικές αναφορές .....</b>	<b>127</b>



## «ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ»

<b>Πίνακας 1.</b> Είδος γάλακτος και η περιεκτικότητα αυτού στα κύρια συστατικά (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009).....	28
<b>Πίνακας 2.</b> Κατάλογος προϊόντων Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) και Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (Π.Γ.Ε.), ΥΠ.Α.Α.Τ. ....	36
<b>Πίνακας 3.</b> Κατηγοριοποίηση των τυριών ως προς την περιεκτικότητα σε υγρασία, σύμφωνα με τον Codex Alimentarius και τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων & Ποτών (Μοάτσου, Γ., Διαλέξεις μαθήματος “Ειδική Τυροκομία”, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Γ.Π.Α.).....	41
<b>Πίνακας 4.</b> Τυπική σύσταση του τυρογάλακτος από γλυκιά και όξινη πηξη (Chatzipaschali <i>et al.</i> , 2012). ....	44
<b>Πίνακας 5.</b> Καταγραφή των κυριότερων πρωτεϊνών που υπάρχουν στο γλυκό τυρόγαλα, η επί τοις εκατό αναλογία κάθε μίας εξ αυτών επί του συνόλου των πρωτεϊνών, το μοριακό βάρος και το ισοηλεκτρικό τους σημείο (τροποποιημένο από Guo, 2019). ....	52
<b>Πίνακας 6.</b> Καταγραφή των συμπυκνωμένων προϊόντων πρωτεΐνης τυρογάλακτος (τροποποιημένο από Kilara & Vaghela, 2018).....	52
<b>Πίνακας 7.</b> Μικροοργανισμοί και η ποσοστιαία περιεκτικότητα σε λιπίδια επί ξηρής βιομάζας (Arous <i>et al.</i> , 2019). ....	59
<b>Πίνακας 8.</b> Συστηματική, κοινή και συνοπτική ονομασία των κορεσμένων λιπαρών οξέων (Akoh, 2017). ....	66
<b>Πίνακας 9.</b> Συστηματική, κοινή και συνοπτική ονομασία των ακόρεστων λιπαρών οξέων (Akoh, 2017). ....	66
<b>Πίνακας 10.</b> Καταγραφή των μεταλλικών αλάτων και των συγκεντρώσεων αυτών, όπως εμπεριέχονται στο θρεπτικό υλικό (Papanikolaou <i>et al.</i> , 2001). ....	74
<b>Πίνακας 11.</b> Περιεκτικότητα του γάλακτος, του πρωτογενούς και του δευτερογενούς τυρογάλακτος σε λακτόζη, πρωτεΐνη και λίπος (g/100g) σύμφωνα με τον αναλυτή Milkoscan™ FT 120. ....	76
<b>Πίνακας 12.</b> Καταγραφή της σύστασης σε συγκεκριμένα στερεά και των χαρακτηριστικών του τελικού υποστρώματος.....	77
<b>Πίνακας 13.</b> Καταγραφή των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας των 8 ελαιογόνων ζυμών στο ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα, με λακτόζη ως πηγή άνθρακα. ....	90
<b>Πίνακας 14.</b> Καταγραφή των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας των 5 ελαιογόνων ζυμών σε σύνθετο θρεπτικό υπόστρωμα, το φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.....	100
<b>Πίνακας 15.</b> Καταγραφή της περιεκτικότητας των λιπιδίων στα κάτωθι ελεύθερα λιπαρά οξέα.....	101
<b>Πίνακας 16.</b> Καταγραφή της περιεκτικότητας των λιπιδίων στα κάτωθι ελεύθερα λιπαρά οξέα.....	103
<b>Πίνακας 17.</b> Καταγραφή της περιεκτικότητας των λιπιδίων στα κάτωθι ελεύθερα λιπαρά οξέα.....	107



<b>Πίνακας 18.</b> Καταγραφή της περιεκτικότητας των λιπιδίων στα κάτωθι ελεύθερα λιπαρά οξέα.....	108
<b>Πίνακας 19.</b> Καταγραφή της περιεκτικότητας των λιπιδίων στα κάτωθι ελεύθερα λιπαρά οξέα.....	110
<b>Πίνακας 20.</b> Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και συγκέντρωση των επιμέρους αποτελεσμάτων, προς συγκριτική αξιολόγηση, από την ανάπτυξη των αντίστοιχων ζυμών σε υπόστρωμα τυρογάλακτος.....	120
<b>Πίνακας 21.</b> Καταγραφή των κύριων λιπαρών οξέων, των οποίων η ποσοστιαία περιεκτικότητα προσδιορίστηκε μέσω αέριας χρωματογραφίας.....	121
<b>Πίνακας 22.</b> Καταγραφή των προδιαγραφών που πρέπει να έχουν οι μεθυλεστέρες, ώστε να μπορούν να αξιοποιηθούν ως βιοκαύσιμο και των μεθόδων ελέγχου των χαρακτηριστικών αυτών.....	122
<b>Πίνακας 23.</b> Καταγραφή της ποσοστιαίας περιεκτικότητας των φυτικών ελαίων στα διάφορα λιπαρά οξέα (Orsanova et al., 2015).....	123

## «ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ»

<b>Εικόνα 1.</b> Γραφική αναπαράσταση της παγκόσμιας αύξησης του πληθυσμού τα τελευταία 70 χρόνια, καθώς και εκτίμηση της αύξησης αυτού έως το 2100, σύμφωνα με τον ΟΗΕ (Population Division, D.E.S.A., United Nations).....	18
<b>Εικόνα 2.</b> Ταξινόμηση των χωρών, παγκοσμίως, με βάση τα εισοδηματικά τους κριτήρια, όπως αυτά προκύπτουν μέσω του Ακαθάριστου Εθνικού Εισοδήματος για το έτος 2017. Οι διάφοροι χρωματισμοί αντιστοιχούν στο εύρος ετήσιου εισοδήματος, όπως παρατίθενται στο άνω μέρος της εικόνας (WORLD BANK GROUP).....	19
<b>Εικόνα 3.</b> Παρουσίαση της παραγωγής αποβλήτων ανά κάτοικο σε όλον τον πλανήτη, για το έτος 2016. Οι διάφοροι χρωματισμοί αντιστοιχούν στο εύρος κιλών αποβλήτων, όπως παρατίθενται στο κάτω μέρος της εικόνας (WORLD BANK GROUP).....	20
<b>Εικόνα 4.</b> Παρουσίαση γραφήματος τύπου ‘πίτας’ με τα ποσοστά (%) συμμετοχής των συγκεκριμένων περιοχών στην παγκόσμια παραγωγή αποβλήτων και ιστογράμματος με τις ποσότητες αποβλήτων ετησίως σε εκατομμύρια τόνους, σύμφωνα με στοιχεία του 2016 (WORLD BANK GROUP). ....	20
<b>Εικόνα 5.</b> Εκτίμηση της ετήσιας παραγωγής αποβλήτων παγκοσμίως για τα έτη 2030 και 2050, (WORLD BANK GROUP). ....	21
<b>Εικόνα 6.</b> Παρουσίαση της ημερήσιας παραγωγής αποβλήτων ανά κάτοικο στις χώρες της Ευρώπης και της Κεντρικής Ασίας σε kg/κάτοικο/ημέρα για το έτος 2016. Με κόκκινο επισημαίνεται η παραγωγή της Ελλάδας (WORLD BANK GROUP)....	21
<b>Εικόνα 7.</b> Ποσοστιαία κατανομή των διαφόρων κατηγοριών αποβλήτων παγκοσμίως .....	22
<b>Εικόνα 8.</b> Ποσοστιαία κατανομή των κατηγοριών αποβλήτων συνολικά και ανά χώρα της ΕΕ (Eurostat). ....	23
<b>Εικόνα 9.</b> Κατανομή των αποβλήτων ανά κατηγορία και διατήρα για τη χρονική περίοδο 2004-2018 (Eurostat).....	24
<b>Εικόνα 10.</b> Ποσοστιαία κατανομή των διαφόρων τρόπων εναπόθεσης των αποβλήτων παγκοσμίως (WORLD BANK GROUP).....	24
<b>Εικόνα 11.</b> Η άκρατη παραγωγή αποβλήτων και οι πρακτικές διαχείρισης οδηγούν σε επιμόλυνση (α) του εδάφους ( <a href="https://www.nationalgeographic.org/">https://www.nationalgeographic.org/</a> ), (β) των υδάτων (Karaouzas, 2016) και (γ) του αέρα ( <a href="https://www.climatecentral.org/">https://www.climatecentral.org/</a> ). ....	25
<b>Εικόνα 12.</b> Απεικόνιση των 2 διαφορετικών μοντέλων, το γραμμικό μοντέλο παραγωγής και απόρριψης και το κυκλικό μοντέλο επαναχρησιμοποίησης και ανακύκλωσης (τροποποιημένο από Weetman, 2016).....	26
<b>Εικόνα 13.</b> Κατανομή της παγκόσμιας παραγωγής αγελαδινού γάλακτος ανά ήπειρο, (I.D.F./W.D.S, 2015). ....	28
<b>Εικόνα 14.</b> Απεικόνιση της παραγωγής αγελαδινού γάλακτος ανά χώρα (Eurostat). 29	
<b>Εικόνα 15.</b> Ποσοστό μη-αγελαδινού γάλακτος επί της συνολικής παραγωγής ανά Ευρωπαϊκή χώρα (Eurostat).....	29

<b>Εικόνα 16.</b> Εξέλιξη του αριθμού των παραγωγών, της παραγωγής αγελαδινού γάλακτος και των ποσοστώσεων στην Ελλάδα του 21 <sup>ου</sup> αιώνα (Ε.Λ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ, 2019).	30
<b>Εικόνα 17.</b> Εξέλιξη του αριθμού των παραγωγών και της παραγωγής πρόβειου και αίγειου γάλακτος στην Ελλάδα του 21ου αιώνα (Ε.Λ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ, 2019).	31
<b>Εικόνα 18.</b> Δηλωθείσα ποσότητα πρόβειου γάλακτος και η μέση τιμή που διαμορφώνεται σε βάθος 20ετίας (Ε.Λ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ, 2019).	31
<b>Εικόνα 19.</b> Δηλωθείσα ποσότητα αίγειου γάλακτος και η μέση τιμή που διαμορφώνεται σε βάθος 20ετίας (Ε.Λ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ, 2019).	32
<b>Εικόνα 20.</b> Απεικόνιση (α) της συνολικής αξίας πωληθέντων προϊόντων ανά κλάδο οικονομικής δραστηριότητας και (β) της συνεισφοράς των επιμέρους βιομηχανιών που απαρτίζουν τον κλάδο της Βιομηχανίας Τροφίμων (ΕΛ.ΣΤΑΤ., 2016).	35
<b>Εικόνα 21.</b> Απεικόνιση (α) της συνολικής αξίας πωληθέντων προϊόντων ανά κλάδο οικονομικής δραστηριότητας και (β) της συνεισφοράς των επιμέρους βιομηχανιών που απαρτίζουν τον κλάδο της Βιομηχανίας Τροφίμων (ΕΛ.ΣΤΑΤ., 2016).	36
<b>Εικόνα 22.</b> Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παρασκευής γραβιέρας (τροποποιημένο από <a href="http://www.frieslandcampinainstitute.com">www.frieslandcampinainstitute.com</a> ).	40
<b>Εικόνα 23.</b> Συλλογή του ορού του γάλακτος (πρωτογενές τυρόγαλα) κατά τη στράγγιση του τυροπήγματος σε ειδικά καλούπια παρασκευής φέτας (Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Γ.Π.Α.).	42
<b>Εικόνα 24.</b> Γενική επισκόπηση των κλασμάτων, που προκύπτουν κατά την επεξεργασία του τυρογάλακτος και των προϊόντων προστιθέμενης αξίας που δύνανται να προκύψουν (τροποποιημένο από Kaur <i>et al.</i> , 2020).	46
<b>Εικόνα 25.</b> Απεικόνιση των διαφορετικών σταδίων μιας μονάδας επεξεργασίας λυμάτων (Dairy processing handbook, Tetra Pak, 1995).	47
<b>Εικόνα 26.</b> Απεικόνιση των 4 σταδίων που συνυπάρχουν κατά την αναερόβια χώνευση (Shouvik <i>et al.</i> , 2020).	49
<b>Εικόνα 27.</b> Απεικόνιση των 4 σταδίων που συνυπάρχουν κατά την αναερόβια χώνευση (Asunis <i>et al.</i> , 2020).	50
<b>Εικόνα 28.</b> Αρχές διήθησης με μεμβράνες (Dairy processing handbook, Tetra Pak, 1995).	51
<b>Εικόνα 29.</b> Απεικόνιση του δισακχαρίτη λακτόζη (Yamauchi, 2013).	53
<b>Εικόνα 30.</b> Τυρί τυρογάλακτος – Μυζήθρα (Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Γ.Π.Α.)	56
<b>Εικόνα 31.</b> Απεικόνιση των κύριων ομάδων λιπιδίων (Hartmann, 2016)	57
<b>Εικόνα 32.</b> Απεικόνιση κυττάρων από στελέχη του γένους <i>Cryptococcus</i> , βαμμένα με τη χρωστική India ink, για να γίνει διακριτή η ζώνη της κάψουλας γύρω από το κύτταρο. Τα 2 μικρά κύτταρα κάτω-αριστερά στην εικόνα έχουν φαγοκυτταρωθεί, ενώ τα μεγάλα (titan cells), διαθέτουν παχιά κάψουλα και δεν φαγοκυτταρώνονται εύκολα από τα κύτταρα του ξενιστή (McDonald <i>et al.</i> , 2012).	60
<b>Εικόνα 33.</b> Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x40), με ευκρινές το αποθηκευμένο λίπος σε ελαιοσταγονίδια εντός του κυττάρου (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).	60

<b>Εικόνα 34.</b> Μικροσκοπική παρατήρηση του <i>T. cutaneum</i> (μεγέθυνση x1000), ύστερα από ανάπτυξη σε γλυκόζη 60g/L και συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης α) 1g/L, β) 3g/L και γ) 5g/L (τροποποιημένο από Wang <i>et al.</i> , 2019). .....	61
<b>Εικόνα 35.</b> Τυπική πορεία κινητικής για τη συσσώρευση λιπιδίων από ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Wynn & Ratledge, 2005; Ochsenreither <i>et al.</i> , 2016). .....	63
<b>Εικόνα 36.</b> Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων υπό συνθήκες παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε ελαιογόνους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (Ochsenreither <i>et al.</i> , 2016) .....	64
<b>Εικόνα 37.</b> Αντιδράσεις αντιστροφής της β-οξειδωσης. Τα ένζυμα που εμπλέκονται είναι τα κάτωθι: (1): θειολάση, (2): υδροξυ-ακυλο-CoA αφυδρογονάση, (3): ενοϋλο-CoA ενυδατάση, (4): ενοϋλο-CoA αναγωγή, (5): αλκοολική αφυδρογονάση, (6): ακυλο-CoA θειεστεράση (Dellomonaco, 2011). .....	65
<b>Εικόνα 38.</b> Αντιδράσεις σχηματισμού ακυλογκκερολών μέσω του μονοπατιού ακυλίωσης της φωσφορικής α-γλυκερόλης (Papanikolaou & Aggelis, 2011a). .....	65
<b>Εικόνα 39.</b> Απεικόνιση των μονοπατιών μετατροπής του μικροβιακού λίπους και των λιπαρών οξέων σε χημικές ουσίες βιομηχανικού ενδιαφέροντος και τα τελικά παραγόμενα προϊόντα (Probst <i>et al.</i> , 2015). .....	68
<b>Εικόνα 40.</b> Η τυροκόμηση της φέτας προϋποθέτει την παστερίωση (α) του γάλακτος (63 °C για 30 λεπτά – Low Temperature Long Time Pasteurization). Το τυρόπηγμα, μετά από 20 λεπτά είναι έτοιμο για τεμαχισμό σε διαστάσεις 2cm*2cm*2cm και, μετά από παραμονή 10 λεπτών εντός τυρολέβητα για αποβολή ορού (β), μεταφέρεται προς στράγγιση και σχηματισμό τυριού σε συγκεκριμένα καλούπια (γ). .....	75
<b>Εικόνα 41.</b> Η τυροκόμηση της μυζήθρας προϋποθέτει τη θέρμανση του πρωτογενούς τυρογάλακτος, προς μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού (α). Σε ειδικό τυρόπανο (τσαντίλα) συγκεντρώνονται οι κροκκιδωμένες πρωτεΐνες και αφήνονται προς στράγγιση (β), ενώ το δευτερογενές τυρόγαλα συλλέγεται (γ) και αποθηκεύεται στους 4 °C, για μετέπειτα χρήση.....	76
<b>Εικόνα 42.</b> Διαχωρισμός των μετουσιωμένων οροπρωτεϊνών από το δευτερογενές τυρόγαλα μέσω φυγοκέντρησης (α) και κατακράτησή τους μέσω διήθησης (β). .....	77
<b>Εικόνα 43.</b> Το δευτερογενές τυρόγαλα πριν (α) και μετά (β) τη φυγοκέντρηση και διήθηση, με τις διαφορές στο χρώμα και τη θολερότητα να είναι ευκρινείς.....	77
<b>Εικόνα 44.</b> Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.....	79
<b>Εικόνα 45.</b> Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το δισακχαρίτη λακτόζη, με την εξίσωση να προκύπτει με βάση το γραμμικό μοντέλο και συντελεστή προσδιορισμού R <sup>2</sup> =0,999. ....	80
<b>Εικόνα 46.</b> Σχηματική απεικόνιση του περιστροφικού εξαμιστήρα για εξάτμιση διαλυμάτων υπό κενό και ρυθμιζόμενη θερμοκρασία.....	81
<b>Εικόνα 47.</b> Αντίδραση μεθυλεστεροποίησης η οποία τελείται σε δύο διακριτά στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο.....	84
<b>Εικόνα 48.</b> Συνοπτική απεικόνιση των αντιδράσεων της νινυδρίνης το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων, προς σχηματισμό του συμπλόκου, μωβ χρώματος (τροποποιημένο από Ανδρικόπουλος, 2015). .....	86

<b>Εικόνα 49.</b> Πρότυπη καμπύλη αναφοράς F.A.N. με βάση το αμινοξύ γλυκίνη, που φέρει μια ελεύθερη αμινομάδα, με την εξίσωση να προκύπτει με βάση το γραμμικό μοντέλο και συντελεστή προσδιορισμού $R^2=0,999$ .....	87
<b>Εικόνα 50.</b> Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Πρωτεΐνης, με βάση την αλβουμίνη του ορού βοδινού (B.S.A.), με την εξίσωση να προκύπτει με βάση το γραμμικό μοντέλο και συντελεστή προσδιορισμού $R^2=0,999$ .....	88
<b>Εικόνα 51.</b> Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x40), με ευκρινές το αποθηκευμένο λίπος σε ελαιοσταγονίδια εντός του κυττάρου (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).....	91
<b>Εικόνα 52.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.....	91
<b>Εικόνα 53.</b> Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης <i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x40) (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).....	92
<b>Εικόνα 54.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.....	92
<b>Εικόνα 55.</b> Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης <i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL Y-2536 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x40) (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).....	93
<b>Εικόνα 56.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL Y-2536 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.....	93
<b>Εικόνα 57.</b> Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης <i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL YB-3594 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x40) (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).....	94
<b>Εικόνα 58.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Papiliotrema laurentii</i> YB-3594 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.....	94
<b>Εικόνα 59.</b> Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης <i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> ACA-DC 5079 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100) (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).....	95
<b>Εικόνα 60.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> ACA-DC 5079 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.....	95
<b>Εικόνα 61.</b> Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης α) <i>Cryptococcus (Naganishia) uzbekistanensis</i> NRRL Y-44 (μεγέθυνσης x40), β) <i>Cutaneotrichosporon cutaneum</i> NRRL Y-2525 (μεγέθυνσης x100) και γ) <i>Trichosporon ovoides</i> ACA-DC 5052 (μεγέθυνσης x40) σε οπτικό μικροσκόπιο (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).....	96
<b>Εικόνα 62.</b> Κινητική ανάπτυξης των α) <i>Cryptococcus (Naganishia) uzbekistanensis</i> NRRL Y-44, β) <i>Trichosporon ovoides</i> ACA-DC 5052 και γ) <i>Cutaneotrichosporon cutaneum</i> NRRL Y-2525 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.....	96
<b>Εικόνα 63.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περίσσεια αζώτου.....	97

<b>Εικόνα 64.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 σε θρεπτικό υπόστρωμα με πενία αζώτου και λακτόζη 107 g/L.....	98
<b>Εικόνα 65.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 σε θρεπτικό υπόστρωμα με πενία αζώτου και λακτόζη 153 g/L.....	99
<b>Εικόνα 66.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.....	102
<b>Εικόνα 67.</b> Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων κατά την καλλιέργεια του <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.....	102
<b>Εικόνα 68.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.....	104
<b>Εικόνα 69.</b> Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων κατά την καλλιέργεια του <i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.....	104
<b>Εικόνα 70.</b> Το υψηλό ιξώδες της καλλιέργειας του <i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL Y-2536 (α), ύστερα από την προσθήκη ακετόνης σχηματίζει νεφέλωμα (β), το οποίο κατακρημνίζεται (γ), αποδίδοντας ένα παχύρευστο, ελαστικό ίζημα (δ) (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).....	105
<b>Εικόνα 71.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL Y-2536 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.....	106
<b>Εικόνα 72.</b> Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων κατά την καλλιέργεια του <i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL Y-2536 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.....	106
<b>Εικόνα 73.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL YB-3594 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.....	108
<b>Εικόνα 74.</b> Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων κατά την καλλιέργεια του <i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL YB-3594 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.....	108
<b>Εικόνα 75.</b> Κινητική ανάπτυξης του <i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> ACA-DC 5079 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.....	110
<b>Εικόνα 76.</b> Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων κατά την καλλιέργεια του <i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> ACA-DC 5079 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.....	110
<b>Εικόνα 77.</b> Απεικόνιση α) των διαφορετικών, και ως προς το χρωματισμό, υγρών της καλλιέργειας, με το υγρό στην περίπτωση του <i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> ACA-DC 5079 να είναι πιο κίτρινο από το αντίστοιχο του <i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y 1511 και β) του στερεού κίτρινου λίπους αριστερά, σε σύγκριση με το διαφανές έλαιο δεξιά, αντίστοιχα.....	111
<b>Εικόνα 78.</b> Απεικόνιση των διαφορετικών κλασμάτων ουδέτερων λιπιδίων σε πλάκα πυριτίου, μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας.....	112



## «ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ»

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Παπανικολάου Σεραφείμ, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων – Γαλακτοκομία».

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που με πλαισίωσαν κατά τη διάρκεια αυτού του ταξιδιού, που συντέλεσαν και βοήθησαν, ο καθείς με το δικό του τρόπο, ώστε να ολοκληρώσω το εγχείρημα αυτό. Αρχικά, τίποτα εξ αυτών δεν θα είχε συμβεί χωρίς την άψογη συνεργασία με τον επιβλέποντα καθηγητή, Παπανικολάου Σεραφείμ, με τον οποίο, ήδη από τις πρώτες ημέρες αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος, αναπτύξαμε μια πολύ εποικοδομητική σχέση, η οποία επισφραγίστηκε με την εμπιστοσύνη του προς το πρόσωπό μου, μέσω της ανάθεσης διεκπεραίωσης της συγκεκριμένης μελέτης. Η συνεχής αλληλεπίδρασή μας, οι συμβουλές και η στήριξη του δρουν ως βασικός πυλώνας της ανέλιξής μου. Παράλληλα, ευχαριστίες αξίζουν στον αναπληρωτή καθηγητή, Μασούρα Θεόφιλο, για την αμεσότητα με την οποία μου προσφέρει οτιδήποτε του ζητήσω και για όσα μου δίδαξε κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και, φυσικά, στον καθηγητή Πολίτη Ιωάννη, τον μέντορα και σύμβουλο που δεν μου επιτρέπει να εφησυχάζω, με προκαλεί και με νουθετεί, με στόχο τη συνεχή αυτοβελτίωση, τον επιστήμονα από τον οποίο πηγάζει όλη η φιλοσοφία του εγχειρήματός μου.

Θερμές ευχαριστίες αξίζουν σε όλο το ανθρώπινο προσωπικό του εργαστηρίου και κυρίως στη συνάδελφο βιολόγο, Καλαντζή Ουρανία, που ωσάν άλλη μητρική φιγούρα μερμνεί για τα πάντα, μας συμβουλεύει και μας διδάσκει, αποτελώντας το θεμέλιο λίθο του εργαστηρίου, αλλά και στις Μίχου Σαββούλα, υποψήφια διδάκτορας και Τσούκο Ερμίντα, μεταδιδάκτορας ερευνήτρια, για την αμέριστη βοήθεια και την υπομονετική συμβουλευτική τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους λοιπούς καθηγητές, συμφοιτητές και συναδέλφους, με τους οποίους αλληλοεπίδρασα τα τελευταία δύο έτη, την οικογένεια και τους φίλους, που μου συμπαραστέκονται και με στηρίζουν καθ' όλη την ακαδημαϊκή μου διαδρομή.



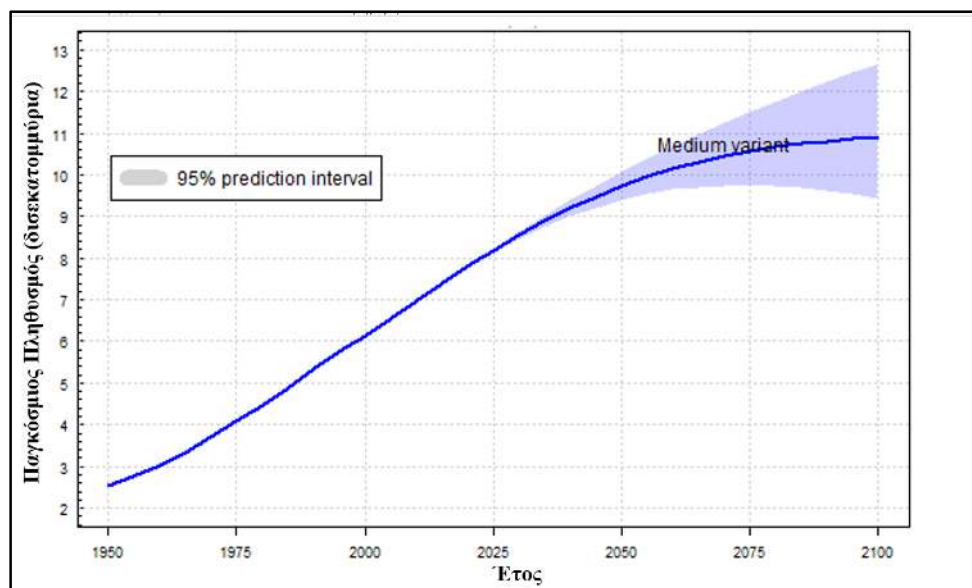
«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

# 1. Εισαγωγή

“Solid wastes are the discarded leftovers of our advanced consumer society. This growing mountain of garbage and trash represents not only an attitude of indifference toward valuable natural resources, but also a serious economic and public health problem”

*Jimmy Carter*

Με τα παραπάνω λόγια, το 1977, ο 39<sup>ος</sup> πρόεδρος των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (1977–1981), James Earl Carter Jr., κατά κόσμον Jimmy Carter, γνωστός για το αίσθημα φιλανθρωπίας του, τους αγώνες του για την κατοχύρωση των ανθρωπίνων δικαιωμάτων και το ίδρυμα “Carter Center”, για τα οποία έλαβε το Νόμπελ Ειρήνης εν έτει 2002, περιέγραψε τον ραγδαία αυξανόμενο όγκο αποβλήτων, ως απόρροια της άκρατης καταναλωτικής αδηφαγίας των πολιτών της σύγχρονης κοινωνίας. Ο παγκόσμιος πληθυσμός του πλανήτη βαίνει αυξανόμενος και κατ’ επέκταση, η εναπόθεση όλων των ειδών αποβλήτων εξαπλώνεται ανεξέλεγκτα.

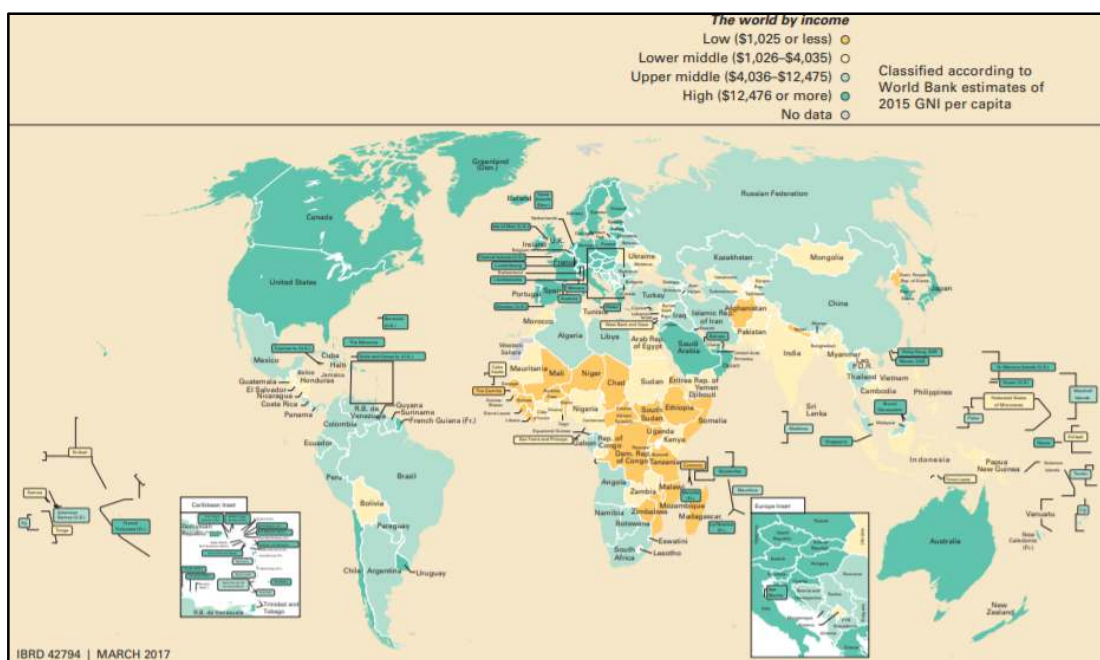


**Εικόνα 1.** Γραφική αναπαράσταση της παγκόσμιας αύξησης του πληθυσμού τα τελευταία 70 χρόνια, καθώς και εκτίμηση της αύξησης αυτού έως το 2100, σύμφωνα με τον ΟΗΕ (Population Division, D.E.S.A., United Nations)

## 1.1. Παραγωγή αποβλήτων |

Ο παγκόσμιος πληθυσμός το έτος 2020 ανέρχεται περί τα 7,8 δισεκατομμύρια ανθρώπους και προβλέπεται ότι το 2100 θα φθάσει τα 11 δισεκατομμύρια [από 9,5 έως 12,5 με διάστημα εμπιστοσύνης Δ.Ε. 95%] (Εικόνα 1). Σύμφωνα με στοιχεία του ‘WORLD BANK GROUP’ για το 2016, παρήχθησαν 2,01 τρισεκατομμύρια κιλά

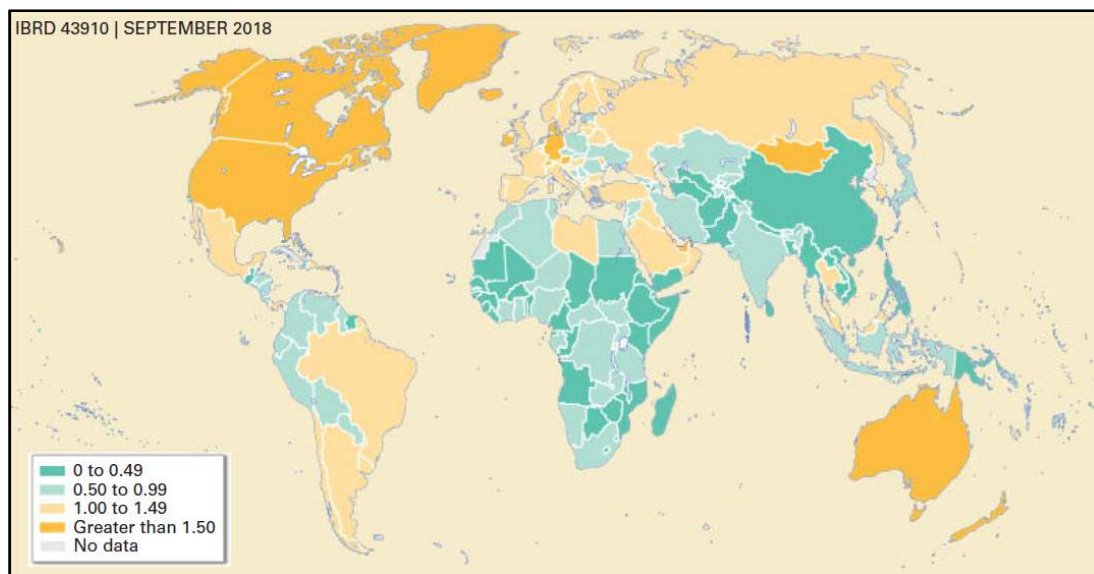
απόβλητα παγκοσμίως. Η κατά κεφαλήν ημερήσια παραγωγή ανήλθε στα 0,74 kg, με το εύρος τιμών να είναι ιδιαίτερα μεγάλο, από 0,11 kg έως 4,54 kg ημερησίως, τιμή που είναι άμεσα σχετιζόμενη με τα εισοδηματικά κριτήρια ανά περιοχή. Οι περισσότερες από τις χώρες της Αφρικής, η Ινδία, η Μογγολία και η Παπούα – Νέα Γουινέα εμφανίζουν τα χαμηλότερα επίπεδα ετήσιου εισοδήματος, με βάση το Ακαθάριστο Εθνικό Εισόδημα, ενώ, αντίθετα, ο Καναδάς, η Γροιλανδία, οι Η.Π.Α., η Χιλή, η Αυστραλία, η Σαουδική Αραβία, και οι περισσότερες χώρες της Ευρώπης, συμπεριλαμβανομένης και της χώρας μας, έχουν το πιο υψηλό εισόδημα (Εικόνα 2).



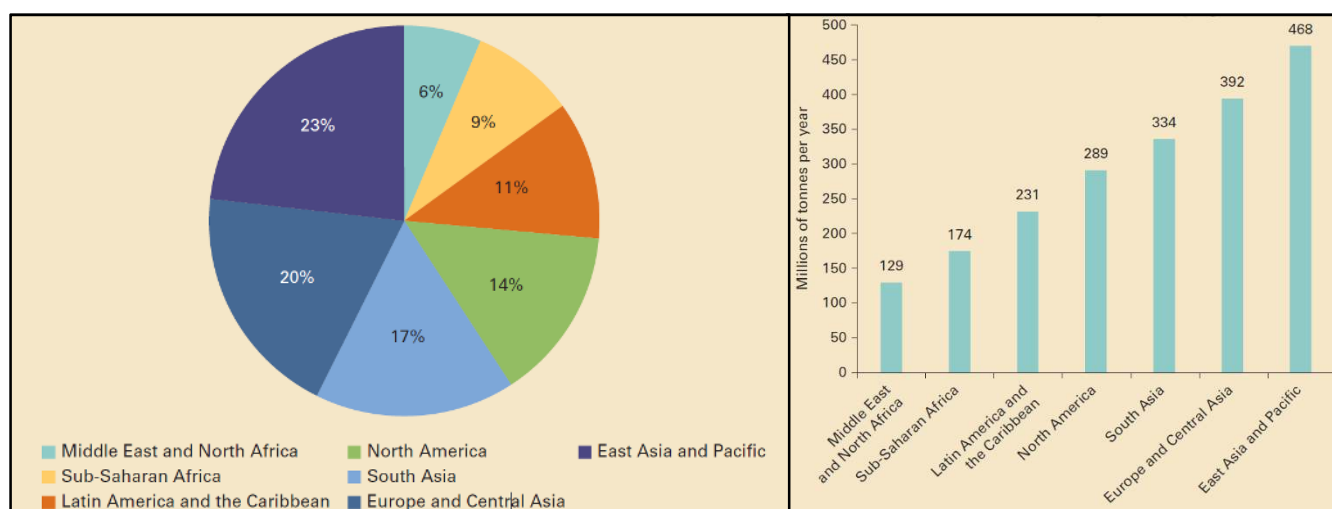
**Εικόνα 2.** Ταξινόμηση των χωρών, παγκοσμίως, με βάση τα εισοδηματικά τους κριτήρια, όπως αυτά προκύπτουν μέσω του Ακαθάριστου Εθνικού Εισοδήματος για το έτος 2017. Οι διάφοροι χρωματισμοί αντιστοιχούν στο εύρος ετήσιου εισοδήματος, όπως παρατίθενται στο άνω μέρος της εικόνας (WORLD BANK GROUP).

Φυσική συνέχεια όσων αναπτύχθηκαν άνωθεν είναι η παραγωγή αποβλήτων ανά κάτοικο να είναι υψηλότερη στις χώρες με υψηλό εισόδημα και χαμηλή κυρίως στις πιο πτωχές περιοχές του πλανήτη (Ινδία, Ινδονησία, Αφρική), με εξαίρεση την Κίνα, η οποία αν και έχει υψηλό Ακαθάριστο Εθνικό Εισόδημα, η κατά κεφαλήν παραγωγή αποβλήτων είναι ιδιαίτερα χαμηλή. (Εικόνα 3). Παρόλα αυτά, οι περιοχές που έχουν χαμηλή κατά κεφαλήν παραγωγή αποβλήτων, λόγω του τεράστιου πληθυσμού τους, ειδικά σε περιοχές όπως η Ινδία, η Κίνα, η Ινδονησία και η Αυστραλία, δηλαδή χώρες της ανατολικής Ασίας και του Ειρηνικού Ωκεανού, εμφανίζουν τη μεγαλύτερη συσσώρευση αποβλήτων (468 εκατομμύρια τόνοι ετησίως), ακολουθούμενες από τις

υπόλοιπες χώρες της Ασίας και την Ευρώπη, με τα στοιχεία να παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 4). Περιοχές όπως ο Καναδάς, με υψηλό εισόδημα, παράγουν υψηλές ποσότητες απορριμμάτων ανά κάτοικο, όμως ο συνολικός όγκος αυτών είναι χαμηλότερος των προαναφερθέντων περιοχών. Αναμενόμενα, οι υποανάπτυκτες χώρες τις Αφρικής, με τους ανθρώπους να ζουν κυρίως υπό απάνθρωπες συνθήκες πείνας και έλλειψης τροφής, εμφανίζουν και το μικρότερο όγκο αποβλήτων.

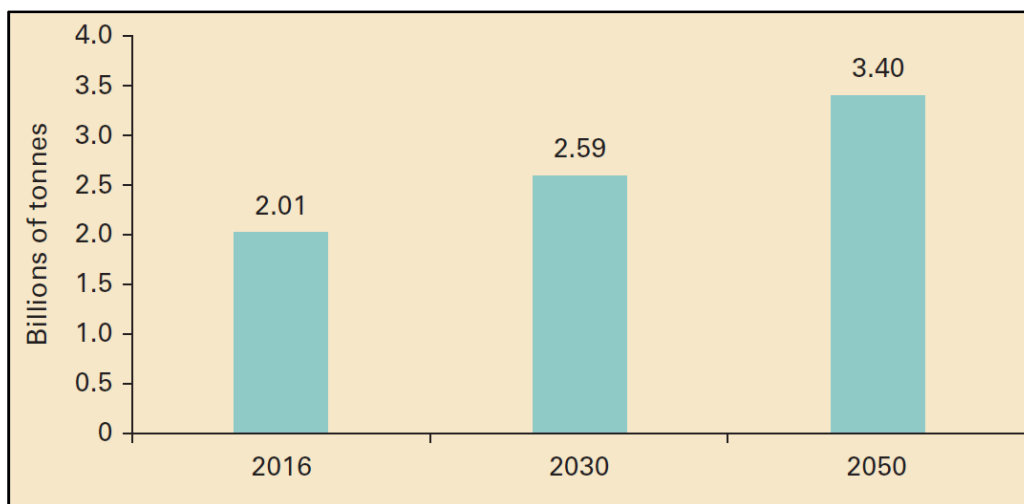


**Εικόνα 3.** Παρουσίαση της παραγωγής αποβλήτων ανά κάτοικο σε όλον τον πλανήτη, για το έτος 2016. Οι διάφοροι χρωματισμοί αντιστοιχούν στο εύρος κιλών αποβλήτων, όπως παρατίθενται στο κάτω μέρος της εικόνας (WORLD BANK GROUP).



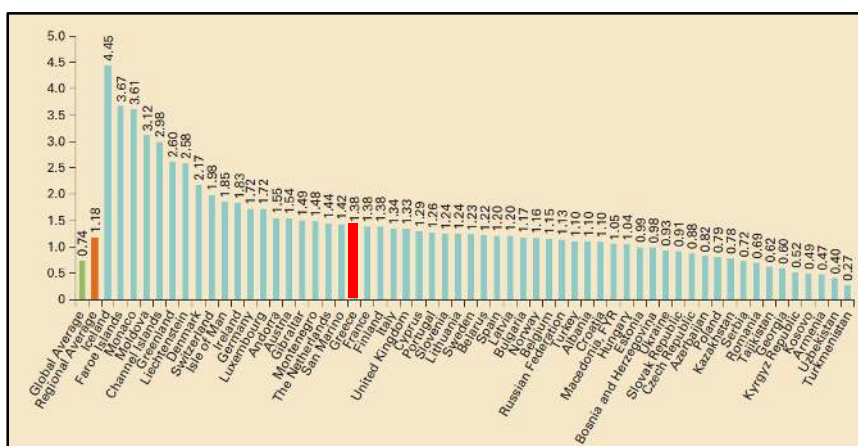
**Εικόνα 4.** Παρουσίαση γραφήματος τύπου ‘πίτας’ με τα ποσοστά (%) συμμετοχής των συγκεκριμένων περιοχών στην παγκόσμια παραγωγή αποβλήτων και ιστογράμματος με τις ποσότητες αποβλήτων ετησίως σε εκατομμύρια τόνους, σύμφωνα με στοιχεία του 2016 (WORLD BANK GROUP).

Έως το 2030 εκτιμάται ότι η ποσότητα των αποβλήτων θα ανέλθει στα 2,59 τρισεκατομμύρια κιλά απόβλητα το χρόνο παγκοσμίως, ενώ το 2050 θα φτάσει τα 3,4 τρισεκατομμύρια κιλά ετησίως (Εικόνα 5). Οι παραπάνω εκτιμήσεις έγιναν συναρτήσει της προβλεπόμενης αύξησης του Ακαθάριστου Εγχώριου Προϊόντος (Α.Ε.Π.) κάθε χώρας και της εκτιμώμενης παγκόσμιας αύξησης πληθυσμού.



**Εικόνα 5.** Εκτίμηση της ετήσιας παραγωγής αποβλήτων παγκοσμίως για τα έτη 2030 και 2050, (WORLD BANK GROUP).

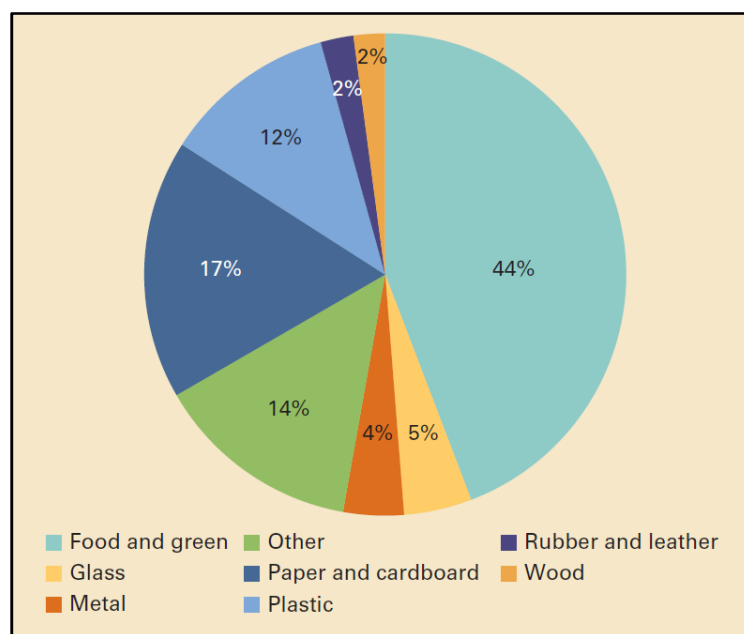
Σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης, η συνολική παραγωγή αποβλήτων για το έτος 2018 ανήλθε στους 2,317 δισεκατομμύρια τόνους, με την Ελλάδα να παράγει περί τους 45,6 εκατομμύρια τόνους και να ανήκει στις χώρες, που η κατά κεφαλήν ημερήσια παραγωγή αποβλήτων είναι υψηλότερη από τον παγκόσμιο μέσο όρο (0,74 kg/κάτοικο/ημέρα) και για τα έτη 2016 και 2018 αντιστοιχούσε σε 1,38 kg/κάτοικο/ημέρα, όπως μαρτυρά το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6.** Παρουσίαση της ημερήσιας παραγωγής αποβλήτων ανά κάτοικο στις χώρες της Ευρώπης και της Κεντρικής Ασίας σε kg/κάτοικο/ημέρα για το έτος 2016. Με κόκκινο επισημαίνεται η παραγωγή της Ελλάδας (WORLD BANK GROUP).

## 1.2. Σύσταση και διάθεση αποβλήτων |

Με τον όρο σύσταση ουσιαστικά εννοούμε την ταξινόμηση των απορριμμάτων στις διάφορες κατηγορίες τους (πλαστικό, γυαλί, χαρτί, οργανικά απόβλητα κ.α.). Για να προσδιοριστεί η σύσταση απαιτούνται επιτόπιοι έλεγχοι σε χώρους εναπόθεσης απορριμμάτων, από τους οποίους λαμβάνονται δείγματα, ταξινομούνται και ζυγίζονται. Σε παγκόσμια κλίμακα, παρατηρούμε (Εικόνα 7) ότι τα οργανικά απόβλητα, φυτικής προέλευσης αλλά και όσα προέρχονται από τρόφιμα, αποτελούν την πλειονότητα με ποσοστό 44%, ενώ τα λεγόμενα «ανακυκλώσιμα» (πλαστικό, χαρτί/χαρτόνι, αλουμίνιο, γυαλί) αποτελούν αθροιστικά το 38%.



Εικόνα 7. Ποσοστιαία κατανομή των διαφόρων κατηγοριών αποβλήτων παγκοσμίως (WORLD BANK GROUP).

Έχει παρατηρηθεί ότι η σύσταση των αποβλήτων ποικίλει ανάλογα με τα επίπεδα εισοδήματος. Καθώς αυτά αυξάνονται, μειώνεται το ποσοστό οργανικών αποβλήτων και αυξάνονται τα ανόργανα απόβλητα, ιδίως το πλαστικό και το χαρτί. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα καταναλωτικά αγαθά στις χώρες αυτές συνήθως συσκευάζονται στα 2 προαναφερθέντα υλικά.


Τα απόβλητα, σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης, προέρχονται κυρίως από κατεδαφίσεις και κατασκευές (Απόβλητα Εκσκαφών Κατεδαφίσεων & Κατασκευών, Α.Ε.Κ.Κ.) σε ποσοστό 35,9%, ακολουθούμενα από τα απόβλητα εξορύξεων και λατόμησης (26,6%). Τα τελευταία καταλαμβάνουν την πρώτη θέση στη χώρα μας, με



ποσοστό 56,4%, ακολουθούμενα από τα βιομηχανικά (11,8%) και τα απόβλητα οικιακής προέλευσης (10,1%), σύμφωνα με στοιχεία της Eurostat για το έτος 2018 (Εικόνα 8). Από στοιχεία της ευρωπαϊκής αρχής προκύπτει, επίσης, ότι τη μεγαλύτερη αύξηση, από το έτος 2004 έως το έτος 2018, γνώρισαν τα υγρά λύματα, αύξηση της τάξης του 175,9% (Εικόνα 9).

<b>Waste generation by economic activities and households, 2018</b> (% share of total waste )						
	Mining and quarrying	Manufacturing	Energy	Construction and demolition	Other economic activities	Households
<b>EU</b>	26.6	10.6	3.4	35.9	15.4	8.2
Belgium	0.1	24.9	1.2	33.5	33.1	7.2
Bulgaria	82.4	2.0	10.0	0.1	3.1	2.4
Czechia	0.2	14.6	1.5	41.7	26.7	15.3
Denmark	0.0	4.7	5.1	56.0	17.8	16.4
Germany	2.2	13.9	2.3	55.5	16.8	9.2
Estonia	29.5	18.8	32.3	9.5	7.6	2.4
Ireland	14.2	24.7	1.1	13.6	35.1	11.4
Greece	56.4	11.8	7.6	5.0	9.2	10.1
Spain	17.1	9.9	2.4	27.6	26.5	16.5
France	0.4	6.6	0.4	70.2	13.7	8.7
Croatia	12.0	8.9	1.3	22.7	31.7	23.3
Italy	0.8	16.5	1.3	35.3	28.7	17.5
Cyprus	6.6	16.3	0.1	45.8	14.5	16.8
Latvia	0.1	21.7	2.5	17.5	25.7	32.6
Lithuania	1.6	37.2	2.1	8.8	30.3	20.0
Luxembourg	0.0	6.9	0.1	81.2	9.7	2.1
Hungary	1.0	14.3	11.2	33.2	25.4	14.9
Malta	1.6	1.0	0.0	78.8	11.2	7.4
Netherlands	0.0	9.6	1.1	70.0	13.3	6.0
Austria	0.1	8.7	0.8	74.4	9.3	6.7
Poland	36.7	17.0	10.7	9.7	20.6	5.3
Portugal	0.2	19.0	1.1	8.8	38.1	32.8
Romania	88.0	3.9	3.4	0.3	2.4	2.1
Slovenia	0.2	20.2	11.8	8.1	51.9	7.8
Slovakia	2.2	27.5	7.9	4.4	39.8	18.2
Finland	74.9	6.7	1.0	12.3	3.5	1.6
Sweden	74.7	3.7	1.4	8.9	8.0	3.2
Iceland	0.0	24.4	0.0	3.9	31.5	40.2
Liechtenstein	1.6	1.5	0.0	88.6	1.6	6.7
Norway	1.2	12.8	1.5	40.0	27.4	17.1
Montenegro	27.4	3.7	27.6	11.3	8.6	21.4
North Macedonia	14.2	46.6	0.5	3.1	35.6	0.0
Serbia	75.6	2.9	14.7	1.1	2.1	3.6
Turkey	17.9	:	26.1	0.0	7.1	28.9
Bosnia and Herzegovina	8.2	28.1	48.1	1.8	0.2	13.6
Kosovo (*) (²)	93.5	2.0	3.4	0.1	0.0	1.0

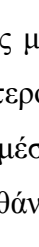
(¹) 2016  
(²) This designation is without prejudice to positions on status, and is in line with UNSCR 1244/1999 and the ICJ Opinion on the Kosovo Declaration of Independence.  
Source: Eurostat (online data code: env\_wasgen)

**eurostat** 

**Εικόνα 8.** Ποσοστιαία κατανομή των κατηγοριών αποβλήτων συνολικά και ανά χώρα της ΕΕ (Eurostat).

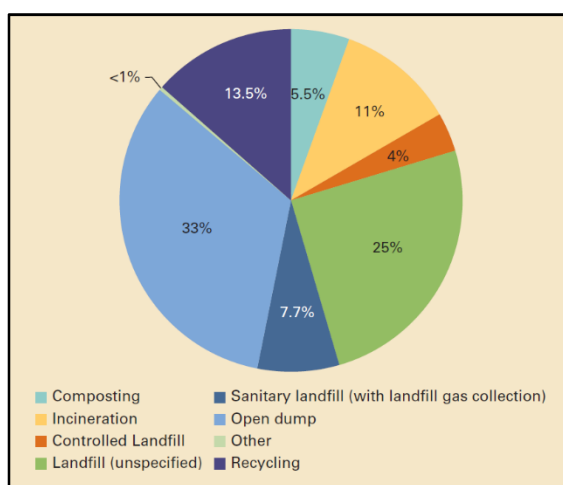
Waste generation, excluding major mineral waste, EU, 2004-2018 (million tonnes)									
	2004	2006	2008	2010	2012	2014	2016	2018	Change 2018/2004 (%)
<b>Total</b>	779.5	789.9	760.5	758.7	758.0	769.0	784.7	812.0	4.2
Agriculture, forestry and fishing	62.3	56.7	45.5	20.2	20.4	17.7	19.7	19.5	-68.8
Mining and quarrying	10.4	7.1	10.0	7.9	7.5	7.7	6.9	8.1	-22.6
Manufacturing	239.9	225.8	216.8	190.5	176.4	175.9	178.9	180.1	-24.9
Energy	85.4	93.3	84.1	78.6	88.8	87.4	74.7	75.7	-11.4
Waste/water	75.2	83.3	98.9	129.9	155.0	180.7	196.9	207.6	175.9
Construction	34.4	33.4	34.8	42.5	39.8	38.6	37.8	41.3	20.1
Other sectors	97.7	111.2	88.8	102.3	88.9	85.1	88.5	94.0	-3.7
Households	174.1	179.2	181.6	186.0	180.7	175.9	181.4	185.7	6.7

Source: Eurostat (online data code: env\_wasgen)

eurostat 

**Εικόνα 9.** Κατανομή των αποβλήτων ανά κατηγορία και διετία για τη χρονική περίοδο 2004-2018 (Eurostat).

Η εναπόθεση αποβλήτων, παγκοσμίως, γίνεται σε χώρους ανεξέλεγκτης διάθεσης αποβλήτων (X.A.Δ.A.) με ποσοστό 33%, ενώ ένα μεγάλο μέρος καταλήγει σε χώρους υγειονομικής ταφής (X.Y.T.A. – X.Y.T.Y.) 36,7%. Επιπρόσθετα, ανάκτηση μέρους αυτών πραγματοποιείται μέσω ανακύκλωσης και κομποστοποίησης 19%, ενώ η μέθοδος της αποτέφρωσης χρησιμοποιείται στο 11% αυτών (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10.** Ποσοστιαία κατανομή των διαφόρων τρόπων εναπόθεσης των αποβλήτων παγκοσμίως (WORLD BANK GROUP).

Η λύση των X.A.Δ.A., ως χώρων διάθεσης αποβλήτων, δεν είναι βιώσιμη, με την κατασκευή και χρήση X.Y.T.A. – X.Y.T.Y. να είναι το πρωταρχικό βήμα προς μια αιφόρο και ‘πράσινη’ διαχείριση αποβλήτων. Η ανάκτηση ολοένα και μεγαλύτερου ποσοστού απορριμμάτων μέσω ανακύκλωσης, για τα ανόργανα απόβλητα και μέσω κομποστοποίησης ή επεξεργασίας προς παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως το βιομεθάνιο και προϊόντων υψηλότερης αξίας, για τα οργανικά παραπροϊόντα, είναι το επόμενο βήμα για μια πιο βιώσιμη κοινωνία (Kaza *et al.*, 2018).

### 1.3. Κυκλική οικονομία – Πράσινη αειφόρα ανάπτυξη |

Η σύγχρονη κοινωνία παράγει τεράστιο όγκο αποβλήτων, που αντιπροσωπεύουν μια απειλή μείζονος σημασίας για το περιβάλλον και κατ' επέκταση για τον άνθρωπο και τα υπόλοιπα έμβια όντα, λόγω του υπερπληθυσμού, της κλιματικής αλλαγής, της υπερθέρμανσης του πλανήτη και της επιμόλυνσης του εδάφους, του αέρα και του υδροφόρου ορίζοντα (Εικόνα 11). Η στρατηγική που ακολουθεί η Ε.Ε., στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας, για να βελτιώσει και ει δυνατόν να αντιστρέψει την κατάσταση, καλείται Ευρωπαϊκή Πράσινη Συμφωνία, με στόχο μια κλιματικά ουδέτερη, αποδοτική ως προς τους πόρους και ανταγωνιστική οικονομία (Circular Economy Action Plan, The European Green Deal, Μάρτιος 2020).

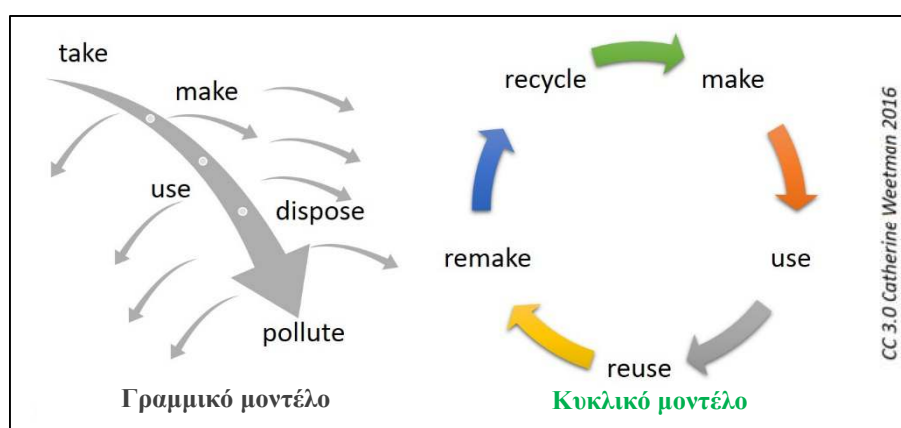


**Εικόνα 11.** Η άκρατη παραγωγή αποβλήτων και οι πρακτικές διαχείρισης οδηγούν σε επιμόλυνση (α) του εδάφους (<https://www.nationalgeographic.org/>), (β) των υδάτων (Karaouzas, 2016) και (γ) του αέρα (<https://www.climatecentral.org/>).

Ο όρος «κυκλική οικονομία» πρωτοεμφανίστηκε στο “The Economics of Natural Resources” (Kneese, 1988) και ενισχύθηκε τα τελευταία χρόνια ελέω της αύξησης των τιμών των πρώτων υλών, της κλιματικής αλλαγής και της οικονομικής κρίσης, ωθώντας την κοινωνία και τις εταιρίες στο να επανεξετάσουν τα παραγωγικά και καταναλωτικά τους πρότυπα, με γνώμονα την ανακύκλωση, την αξιοποίηση των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και την επίτευξη του κέρδους, χωρίς τη ζημία του περιβάλλοντος. Η κυκλική οικονομία δομείται με στόχο την εξάλειψη των απορριμμάτων και της ρύπανσης, τη διατήρηση και επαναχρησιμοποίηση των υλικών και την αξιοποίηση των φυσικών και ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, αποτελώντας ένα ανθεκτικό, κατανομημένο, ποικίλο και άνευ αποκλεισμών οικονομικό μοντέλο,

στοχεύοντας στην βιώσιμη ανάπτυξη και την πράσινη οικονομία (Sustainable Development Goals, O.H.E., 2015).

Το μοντέλο βιώσιμης ανάπτυξης, που βασίζεται στην οικονομική, κοινωνική και περιβαλλοντική παραγωγή και κατανάλωση αποσκοπεί στην οικοδόμηση μιας βιώσιμης κοινωνίας, σε αντίθεση με το γραμμικό μοντέλο, που επικρατεί ακόμη και σήμερα (Εικόνα 12). Σε αντίθεση με το γραμμικό αυτό μοντέλο, όπου το πετρέλαιο είναι η κινητήριος δύναμη της παγκόσμιας αγοράς ενέργειας και προϊόντων, με τα παραγόμενα προϊόντα να καταναλώνονται και οι περιέκτες να απορρίπτονται σε χώρους απορριμμάτων, το κυκλικό μοντέλο προάγει την επαναχρησιμοποίηση, την ανακύκλωση και την αξιοποίηση των ρευμάτων αποβλήτων, αλλά πρωτίστως των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, αποσυνδέοντας την εξάρτηση από πεπερασμένους πόρους.



**Εικόνα 12.** Απεικόνιση των 2 διαφορετικών μοντέλων, το γραμμικό μοντέλο παραγωγής και απόρριψης και το κυκλικό μοντέλο επαναχρησιμοποίησης και ανακύκλωσης (τροποποιημένο από Weetman, 2016).

## 1.4. Η γαλακτοκομία |

Το γάλα και τα προϊόντα που παράγονται απ' αυτό αποτελούν σημαντικό μέσο πρόσληψης πολλών και διαφόρων θρεπτικών συστατικών, που συμβάλλουν σε μια ισορροπημένη και υγιεινή διατροφή, με ένα ευρύ φάσμα θρεπτικών στοιχείων, όπως ασβέστιο, πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας κ.α. Το βιολογικά διαθέσιμο ασβέστιο του συμβάλλει στη δημιουργία και διατήρηση της υγείας των οστών, ενώ παράλληλα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις διάφορες μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση, της οποίας μέλος είναι και η χώρα μας, θεωρείται περιοχή με ιδιαίτερα ανεπτυγμένη γαλακτοκομία. Συγκεκριμένα, συμβάλει κατά 24,9% στην παγκόσμια παραγωγή αγελαδινού γάλακτος (Εικόνα 13), 17,9% στην παραγωγή αίγειου γάλακτος και κατά 18,4% σε αυτή του πρόβειου γάλακτος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το αγελαδινό γάλα, εντός Ε.Ε., αντιστοιχεί στο 97% της συνολικής παραγωγής νωπού γάλακτος (Μασσούρας, 2015).

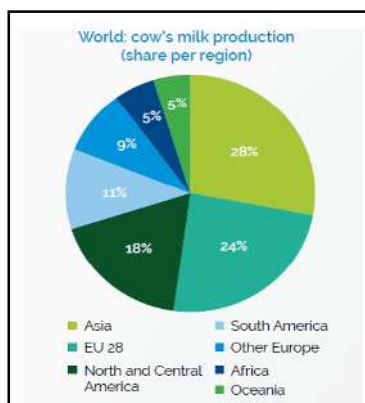
### **1.4.1. Το γάλα**

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών της Ανεξάρτητης Αρχής Δημοσίων Εσόδων ως νωπό γάλα νοείται «το γάλα που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες μιας ή περισσότερων αγελάδων, προβατίνων, αιγών ή βουβαλίδων, το οποίο δεν έχει θερμανθεί πέραν των 40 °C, ούτε έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με ισοδύναμο αποτέλεσμα».

Αντίστοιχα, ως γάλα που προορίζεται για την παρασκευή προϊόντων με βάση το γάλα νοείται «είτε το νωπό γάλα που προορίζεται για μεταποίηση, είτε το υγρό ή κατεψυγμένο γάλα, που λαμβάνεται από νωπό γάλα, το οποίο έχει ή δεν έχει υποστεί επιτρεπόμενη φυσική επεξεργασία, όπως θερμική επεξεργασία ή θέρμισμα, και του οποίου έχει ή δεν έχει τροποποιηθεί η σύνθεση, εφόσον οι εν λόγω τροποποιήσεις περιορίζονται στην προσθήκη ή/και την αφαίρεση φυσικών συστατικών του γάλακτος» (Άρθρο 79, Κ.Τ.Π., 2016).

Ο όρος «γάλα» απλά, χωρίς να συνοδεύεται από κάποιο επίθετο, αντιστοιχεί αποκλειστικά και μόνο σε γάλα, το οποίο: α) Προέρχεται από αγελάδα. β) Είναι νωπό. γ) Είναι πλήρες. δ) Δεν έχει υποστεί αφυδάτωση ή συμπύκνωση ε) Δεν περιέχει άλλες ύλες που έχουν προστεθεί από έξω. Σε περίπτωση που το γάλα δεν είναι αγελαδινό, πρέπει να φέρει έναν από τους όρους «Κατσίκας», «Προβάτου», «Βουβάλου» ή «Ανάμικτο Προβάτου – Κατσίκας» (Άρθρο 80, Κ.Τ.Π., 2016). Η Ασία, ακολουθούμενη από την Ευρώπη είναι οι πιο υψιπαραγωγές περιοχές αγελαδινού γάλακτος (Εικόνα 13).





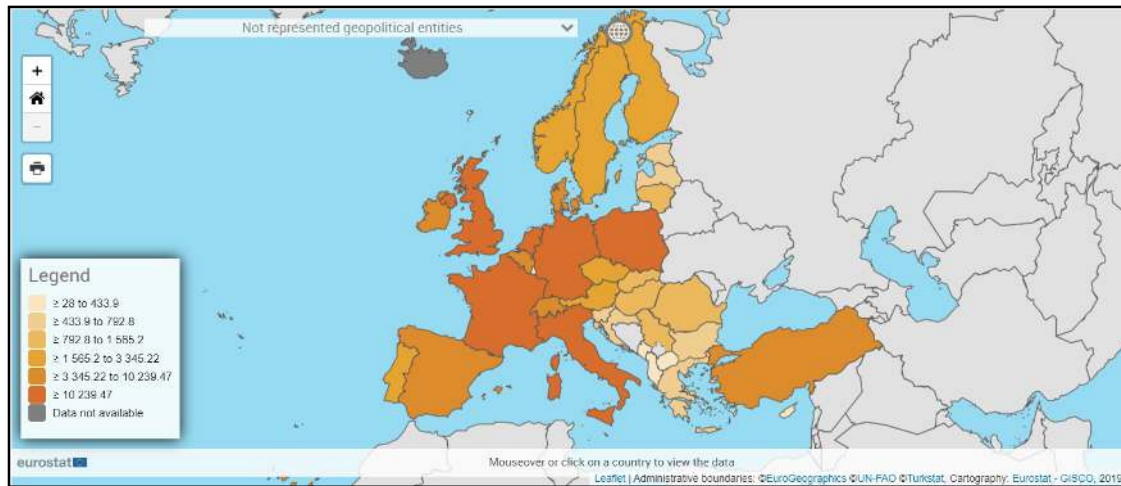
**Εικόνα 13.** Κατανομή της παγκόσμιας παραγωγής αγελαδινού γάλακτος ανά ήπειρο, (I.D.F./W.D.S, 2015).

Τα κύρια χαρακτηριστικά του γάλακτος είναι το νερό, το λίπος, η λακτόζη, οι πρωτεΐνες (καζεΐνες και πρωτεΐνες του ορού) και τα ανόργανα στοιχεία. Ανάλογα από το είδος ζώου, από το οποίο προέρχεται το γάλα, η σύστασή του διαφοροποιείται. Στον Πίνακα 1 αναγράφεται η σύσταση του γάλακτος σε αντιστοιχία με το ζώο προελεύσεως στην Ελλάδα (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009).

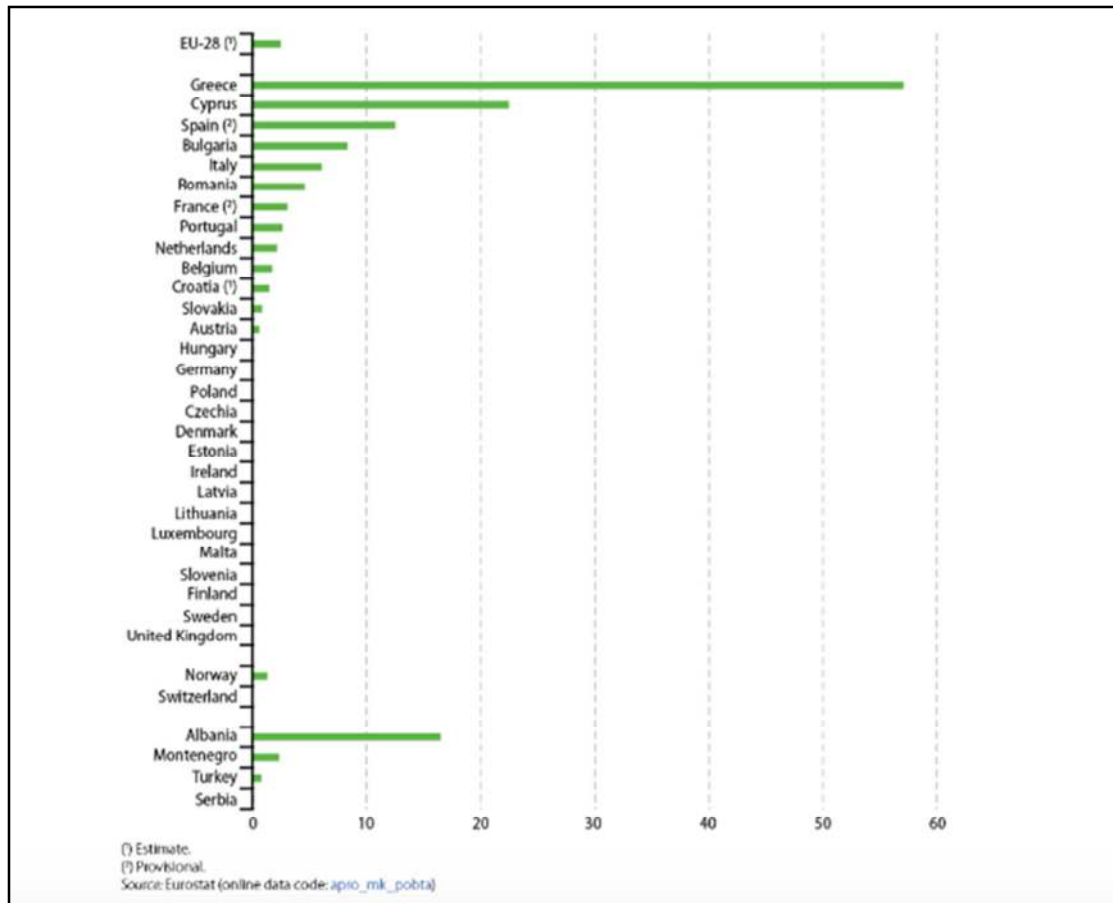
**Πίνακας 1.** Είδος γάλακτος και η περιεκτικότητά αυτού στα κύρια συστατικά (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009).

Είδος Γάλακτος	Λίπος %	Πρωτεΐνες%	Λακτόζη%	Σ.Υ.Α.Λ.%	Ανόργανα και Δευτερεύοντα Συστατικά%
Αγελαδινό	3,95	3,29	4,82	8,82	0,71
Πρόβειο	6,64	5,68	4,77	11,18	0,73
Αίγειο	4,71	3,73	4,48	9,05	0,84

Η παραγωγή αγελαδινού γάλακτος στην Ελλάδα, το 2018, ανήλθε σε 620.900 τόνοι και αντιστοιχεί σε ποσοστό 0,4% της παραγωγής σε Ευρωπαϊκό επίπεδο, με τις χώρες της Κεντρικής Ευρώπης να έχουν ιδιαίτερα υψηλή παραγωγή (Εικόνα 14) (Collection of cow's milk, Eurostat). Όμως, στην περίπτωση αίγειου και πρόβειου γάλακτος, το ποσοστό αυτό είναι σημαντικά υψηλότερο. Συγκεκριμένα, η παραγωγή αίγειου γάλακτος ανήλθε σε 152.475 τόνους (6,6% στην Ε.Ε.) και η αντίστοιχη πρόβειου γάλακτος σε 672.929 τόνους (24% στην Ε.Ε.) (Ε.Λ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ, 2019). Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι η παραγωγή μη-αγελαδινού νωπού γάλακτος στην Ελλάδα αγγίζει ποσοστό της τάξης του 57,1%, αποτελώντας αξιόλογη πρώτη ύλη για την παραγωγή πληθώρας προϊόντων στη χώρα της (Εικόνα 15).



Εικόνα 14. Απεικόνιση της παραγωγής αγελαδινού γάλακτος ανά χώρα (Eurostat).



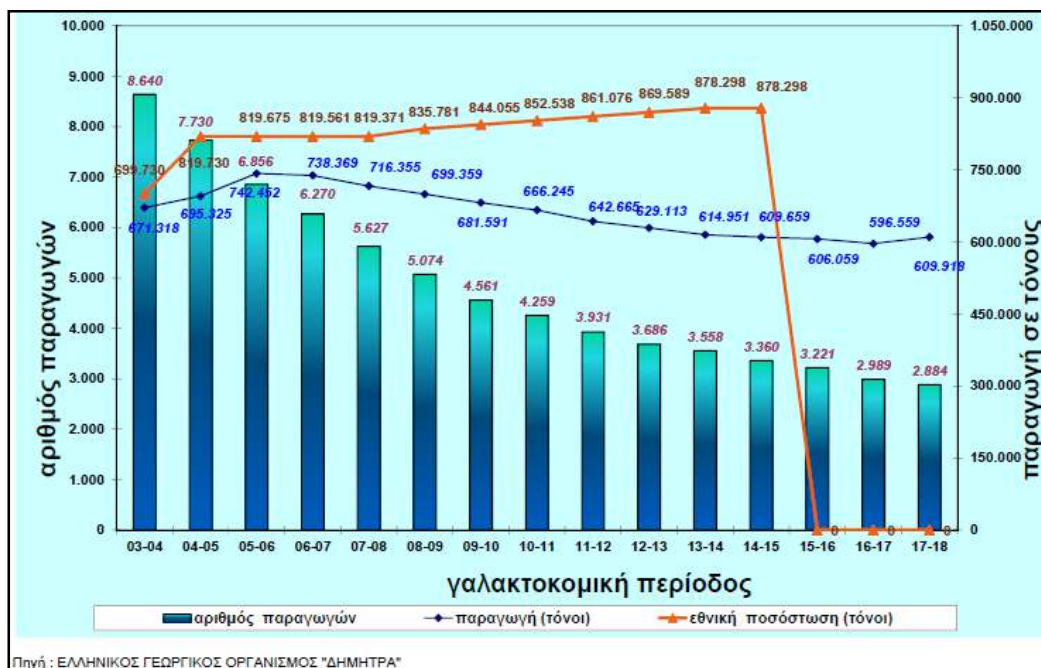
Εικόνα 15. Ποσοστό μη-αγελαδινού γάλακτος επί της συνολικής παραγωγής ανά Ευρωπαϊκή χώρα (Eurostat).



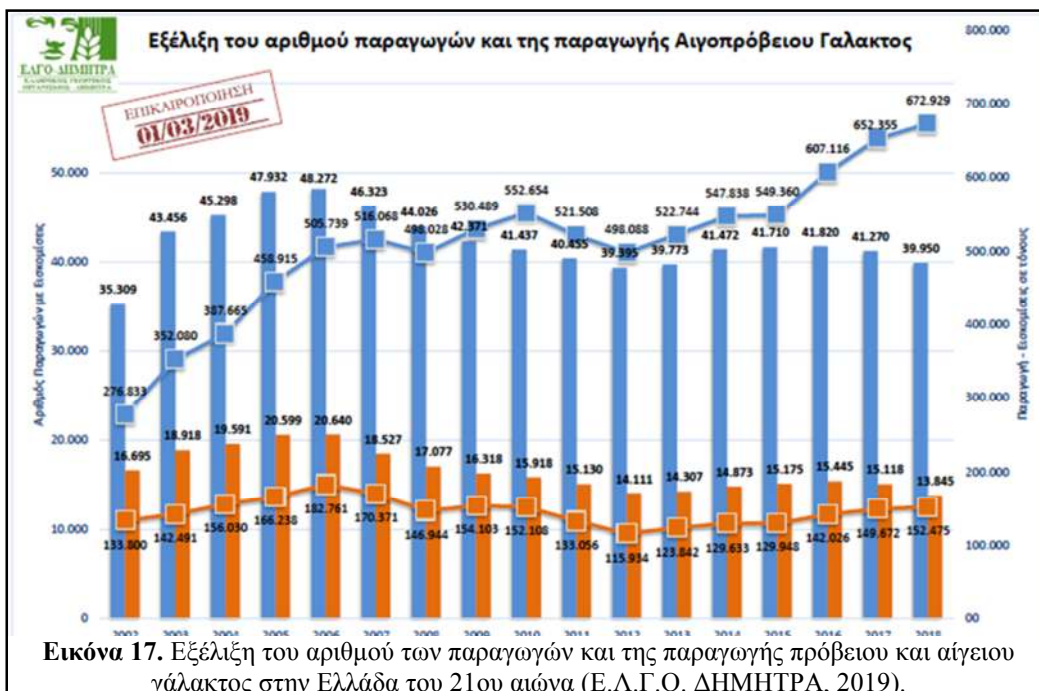
### 1.4.2. Η γαλακτοβιομηχανία στην Ελλάδα

Η Ελλάδα αποτελεί χώρα με μεγάλη παράδοση στην κτηνοτροφία, ειδικά αυτή των μικρών μηρυκαστικών, αιγών και προβάτων. Παρά τις προσπάθειες και μέχρι το Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, ο κλάδος παραγωγής γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων δεν είχε καταφέρει να αναπτυχθεί. Πολλοί μελετητές απέδιδαν το πρόβλημα στην υποανάπτυκτη κτηνοτροφία και κατ' επέκταση στην έλλειψη ζωοτροφών. Η παραγωγή αγελαδινού γάλακτος δεν μπορούσε να καλύψει τη ζήτηση της αγοράς. Επίσης, δυσκολίες υπήρχαν και στην διατήρηση των προϊόντων και στη διάθεση της σε απομακρυσμένες από τον τόπο παραγωγής περιοχές (Χατζηόλου, 1941).

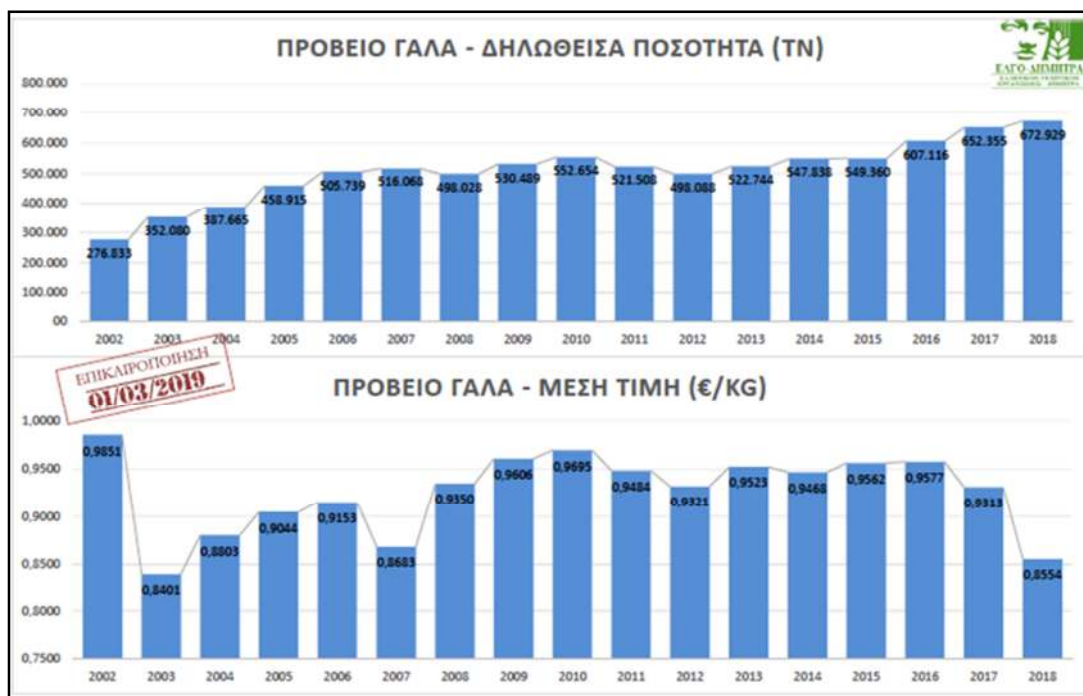
Από της αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα, ο αριθμός παραγωγών αγελαδινού γάλακτος είχε φθίνουσα πορεία, παρ' όλα αυτά η παραγωγή αγελαδινού γάλακτος παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα (περίπου 661.329,2 τόνοι), κυρίως λόγω της ανάπτυξης του τομέα της Γαλακτοκομίας (Εικόνα 16). Οι αριθμοί παραγωγών τόσο αίγειου όσο και πρόβειου γάλακτος βρίσκονται σε σταθερά επίπεδα τα τελευταία χρόνια (Εικόνα 17). Η παραγωγή πρόβειου γάλακτος γνωρίζει ραγδαία αύξηση (243% η παραγωγή το 2018 σε σχέση με το 2002) (Εικόνα 18), με την παραγωγή του αίγειου γάλακτος να παραμένει σε χαμηλά μεν, αλλά σταθερά επίπεδα δε (Εικόνα 19) (Ε.Λ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ, 2019).



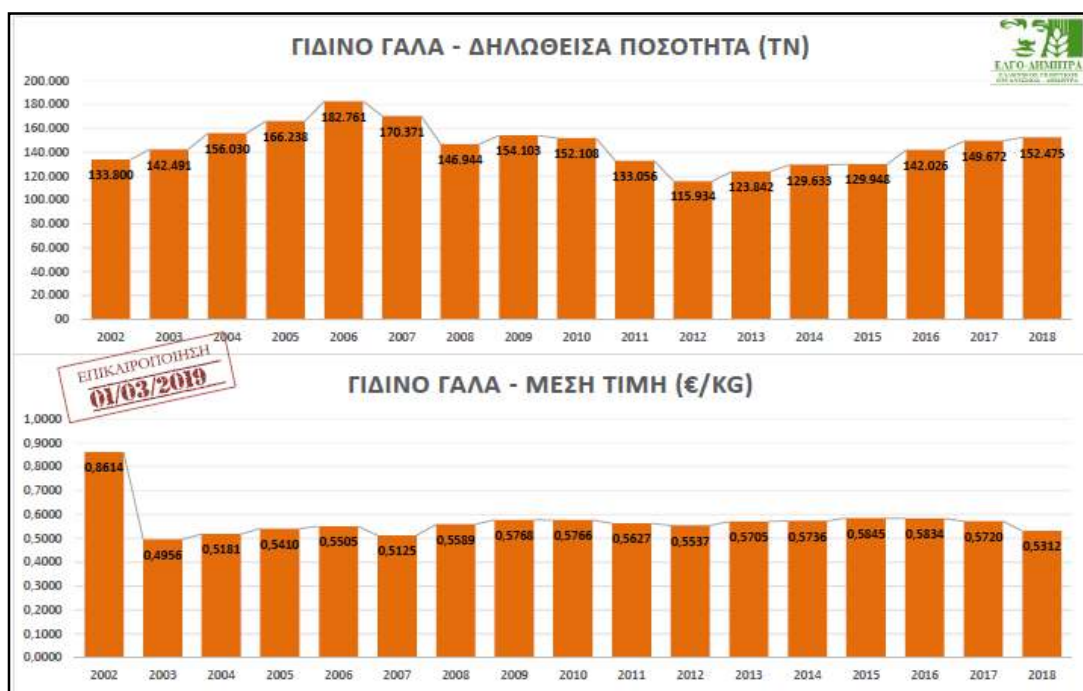
**Εικόνα 16.** Εξέλιξη του αριθμού των παραγωγών, της παραγωγής αγελαδινού γάλακτος και των ποσοστίασεων στην Ελλάδα του 21<sup>ου</sup> αιώνα (Ε.Λ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ, 2019).



Εικόνα 17. Εξέλιξη του αριθμού των παραγωγών και της παραγωγής πρόβειου και αίγειου γάλακτος στην Ελλάδα του 21ου αιώνα (Ε.Λ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ, 2019).



Εικόνα 18. Δηλωθείσα ποσότητα πρόβειου γάλακτος και η μέση τιμή που διαμορφώνεται σε βάθος 20ετίας (Ε.Λ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ, 2019).



**Εικόνα 19.** Δηλωθείσα ποσότητα αίγειου γάλακτος και η μέση τιμή που διαμορφώνεται σε βάθος 20ετίας (Ε.Λ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ, 2019).

Η τιμή πώλησης του νωπού αγελαδινού γάλακτος, από τον παραγωγό, σύμφωνα με τον ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, για το 2018 κυμάνθηκε στα 0,3991 €/kg. Η τιμή πώλησης αντίστοιχα του αίγειου γάλακτος, την ίδια χρονιά, ανήλθε στα 0,5312 €/kg και του πρόβειου στα 0,8554 €/kg, όπως παρατηρούμε από τα άνωθεν διαγράμματα (Ε.Λ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ, 2019).

Γίνεται λοιπόν αντιληπτό, ότι τόσο σε επίπεδο αγροτικής όσο και εθνικής οικονομίας, ο τομέας της γαλακτοκομίας έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί προσφέρει απασχόληση σε χιλιάδες οικογένειες. Πιο συγκεκριμένα, περί τις 115.000 οικογένειες ασχολούνται με την κτηνοτροφία και 300.000 άτομα βρίσκουν μερική ή πλήρη απασχόληση στον πρωτογενή τομέα της παραγωγής του γάλακτος (Μασσούρας, 2015).

Σύμφωνα με στοιχεία της Ελληνικής Στατιστικής Υπηρεσίας, σχετικά με τις κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις και τον αριθμό των ζώων το έτος 2016, καταγράφηκαν 14.699 εκμεταλλεύσεις βοοειδών με 615.123 ζώα και 150.079 εκμεταλλεύσεις αιγοπροβάτων, με τον συνολικό αριθμό ζώων να ανέρχεται στα 11.769.306 αιγοπρόβατα [8.227.631 πρόβατα – 3.451.631 αίγες] (Ελλάς με αριθμούς, Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία, 2020). Οι πληθυσμοί των προβάτων και αιγών που απαντώνται στη χώρα μας, αντιστοιχούν στο 12% των προβάτων και 48% των αιγών

στο σύνολο της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Διαφαίνεται, λοιπόν, ότι η Ελλάδα συμβάλλει ελάχιστα στη διαμόρφωση της παραγωγής αγελαδινού γάλακτος στην Ε.Ε., αντίθετα όμως η συμβολή της σε πρόβειο και αίγειο γάλα είναι σημαντική και κατέχει τη δεύτερη θέση μεταξύ των χωρών της Κοινότητας. Σε παγκόσμιο επίπεδο καταλαμβάνει τη μεγαλύτερη κατά κάτοικο παραγωγή σε αιγοπρόβειο γάλα, ενώ καταλαμβάνει την τέταρτη και πέμπτη θέση σε παραγωγή πρόβειου και αίγειου γάλακτος, αντίστοιχα (Μασσούρας, 2015).

Ο κλάδος των γαλακτοκομικών προϊόντων κατέχει σημαντική θέση στον ευρύτερο κλάδο των τροφίμων, περιλαμβάνοντας μερικές από τις μεγαλύτερες βιομηχανίες ειδών διατροφής της χώρας. Το σύνολο της γαλακτοπαραγωγής αξιοποιείται από περίπου 950 μονάδες επεξεργασίας γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, η πλειονότητα των οποίων είναι μικρού μεγέθους, με ετήσια παραγωγή κάτω των 100 τόνων. Στον αντίποδα, ελάχιστες είναι οι επιχειρήσεις με ετήσια παραγωγή άνω των 10.000 τόνων. Το αιγοπρόβειο γάλα αξιοποιείται σε ποσοστό 90% για παραγωγή τυριών, ενώ το αγελαδινό κατά κύριο λόγο (80%) οδηγείται προς εμφιάλωση (Μασσούρας, 2015).

Οι μεγάλοι μεγέθους βιομηχανικές επιχειρήσεις, καλύπτουν και το σημαντικότερο μέρος της συνολικής αγοράς γαλακτοκομικών προϊόντων, με τις μικρομεσαίες παραγωγικές μονάδες να καλύπτουν τις ανάγκες της εκάστοτε τοπικής αγοράς, στην οποία εντάσσονται. Με δεδομένο ότι ο κλάδος παρουσιάζει σημαντική ανομοιογένεια μεταξύ των διαφόρων εταιριών, στην αλυσίδα της διανομής των προϊόντων εμπλέκονται τοπικοί αντιπρόσωποι, καθώς και επιχειρήσεις διανομών με τοπικά ή ευρύτερα δίκτυα διανομής. Η διάθεση των προϊόντων γίνεται κυρίως μέσω super markets και μικρών σημείων πώλησης όπως περίπτερα, φούρνοι, ζαχαροπλαστεία, παντοπωλεία, κ.α. (Χατζηχρήστου, 2010).

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν βασικό είδος διατροφής και η ζήτηση τους παρουσιάζει σχετικά χαμηλή ελαστικότητα ως προς την τιμή και το διαθέσιμο εισόδημα. Η στροφή των καταναλωτών σε υγιεινότερους τρόπους διατροφής, η άνοδος του βιοτικού επιπέδου και του διαθέσιμου εισοδήματος ενίσχυσαν την συνολική κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων και ειδικότερα των προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Παρατηρείται αύξηση της ζήτησης ορισμένων προϊόντων όπως για παράδειγμα το φρέσκο γάλα και το γιαούρτι, καθώς και

προϊόντων με χαμηλότερα λιπαρά. Η εγχώρια κατανάλωση τυροκομικών προϊόντων κυμαίνεται περίπου 360.000 τόνους, με το βαθμό αυτάρκειας της αγοράς να ανέρχεται σε υψηλά επίπεδα, με τα ελληνικά προϊόντα να καλύπτουν το 75% της συνολικής εγχώριας κατανάλωσης τυριών τα τελευταία 5 χρόνια και το υπόλοιπο ποσοστό να καλύπτεται από εισαγόμενα προϊόντα (Χατζηχρήστου, 2010).

## 1.5. Η τυροκομία |

---

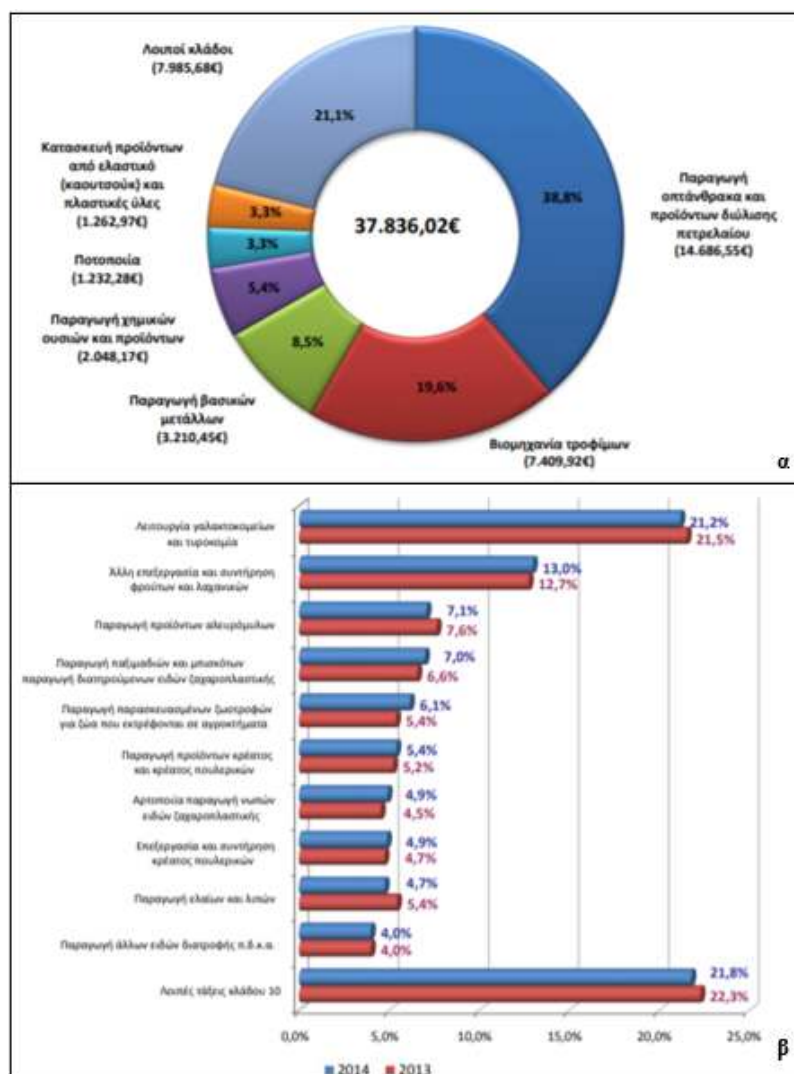
Η τυροκόμηση πιθανολογείται ως μια τυχαία ανακάλυψη των λαών της Μέσης Ανατολής, ως τρόπος συντήρησης και αξιοποίησης των θρεπτικών συστατικών του γάλακτος, με την πρώτη τυροκόμηση να εκτιμάται πριν από περίπου 8 χιλιετίες, όταν ένας Άραβας έμπορος μετέφερε, στην έρημο, γάλα μέσα σε έναν ασκό, φτιαγμένο από στομάχι προβάτου. Τα ένζυμα και η μικροβιακή χλωρίδα του στομάχου του ζώου, σε συνδυασμό με την εξωτερική θερμοκρασία που επικρατούσε, οδήγησε στο σχηματισμό του τυροπήγματος. Σύμφωνα με την Ελληνική μυθολογία, η παρασκευή του τυριού θεωρείται ως «παντοτινό δώρο θεών», με τον πρώτο τυροκόμο να είναι ο Κύκλωπας Πολύφημος, σύμφωνα με την Οδύσσεια του Ομήρου (Ανυφαντάκης, 2004).

Η τυροκομία θεωρείται η κυριότερη μορφή μεταποίησης και αξιοποίησης του γάλακτος, οδηγώντας σε ένα προϊόν υψηλής θρεπτικής και βιολογικής αξίας, με μεγάλο διάστημα διατήρησης. Στην Ελλάδα, όπως και στις περισσότερες χώρες ανά τον κόσμο, μέχρι και τα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα, η παρασκευή τυριών γινόταν σε οικοτεχνικό επίπεδο και μικρές βιοτεχνίες. Η τυροκόμηση, κυρίως βασιζόμενη στην εμπειρία του εκάστοτε κτηνοτρόφου-παραγωγού, προσέδιδε στο τυρί ιδιαίτερους δευτερογενείς χαρακτήρες, προερχόμενους από τα κλιματολογικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά της περιοχής. Η επιστήμη της γεωπονίας, τον 20<sup>ο</sup> αιώνα, σε συνδυασμό με την εκθετική πρόοδο των επιστημών της χημείας και της μικροβιολογίας, οδήγησαν σε ραγδαία ανάπτυξη της γαλακτοκομίας στη χώρα μας και στην τυποποίηση της παραγωγικής διαδικασίας των διαφόρων προϊόντων, αλλά και της κατοχύρωσης πολλών εξ' αυτών με σήματα ποιότητας (Π.Ο.Π., Π.Γ.Ε., Ε.Π.Ι.Π.) (Ανυφαντάκης, 2004). Τα τυριά της χώρας μας, σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, που έχουν λαμβάνειν σήμα ποιότητας Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) ή Προστατευόμενης



Γεωγραφικής Ένδειξης (Π.Γ.Ε.), στα πλαίσια του υπ' αριθμόν Κανονισμού (ΕΟΚ) 510/06 του Συμβουλίου, καταγράφονται στον παρακάτω κατάλογο (Πίνακας 2).

Ο τομέας της γαλακτοκομίας και των σχετικών προϊόντων, υπάγεται στον κλάδο της Βιομηχανίας Τροφίμων, με τη συνολική αξία πωληθέντων για το ημερολογιακό έτος 2014 να ανέρχεται περί τα 7,4 δισεκατομμύρια ευρώ και το 21,2% του ποσού αυτού να προέρχεται από τη λειτουργία των γαλακτοκομείων και των τυροκομείων, σύμφωνα με έρευνα παραγωγής και πωλήσεων βιομηχανικών προϊόντων για τα έτη 2013-2014 (Εικόνα 19, ΕΛ.ΣΤΑΤ., 2016) (Εικόνα 20). Από τα ιδιαίτερα προϊόντα που παράγονται στην Ελλάδα (γαλακτοκομικά, οίνος, ελαιόλαδο, μάρμαρο, ούζο και τσίπουρο), η φέτα και το κεφαλοτύρι κατέλαβαν την πρώτη θέση σε πωλήσεις για το έτος 2018, σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Αρχή.



**Εικόνα 20.** Απεικόνιση (α) της συνολικής αξίας πωληθέντων προϊόντων ανά κλάδο οικονομικής δραστηριότητας και (β) της συνεισφοράς των επιμέρους βιομηχανιών που απαρτίζουν τον κλάδο της Βιομηχανίας Τροφίμων (ΕΛ.ΣΤΑΤ., 2016).

**Πίνακας 2.** Κατάλογος προϊόντων Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) και Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (Π.Γ.Ε.), ΥΠ.Α.Α.Τ. .

A/A	ΠΡΟΙΟΝ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΠΟΠ ή ΠΓΕ	ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ
1	Ανεβατό	ΠΟΠ	313060/14.01.94 (ΦΕΚ 24/18.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
2	Γαλοτύρι	ΠΟΠ	313031/11.01.94 (ΦΕΚ 8/11.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
3	Γραβιέρα Αγράφων	ΠΟΠ	313045/14.01.94 (ΦΕΚ 16/14.01.94) 313045/14.01.94 (ΦΕΚ 101 Β'/16.02.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
4	Γραβιέρα Κρήτης	ΠΟΠ	313047/14.01.94 (ΦΕΚ 16/14.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
5	Γραβιέρα Νάξου	ΠΟΠ	Προδιαγραφές 313071/18.01.94(ΦΕΚ 23/18.01.94) 318849/21.08.08(ΦΕΚ 1725/28.08.08) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
6	Καλαθάκι Λήμνου	ΠΟΠ	313044/14.01.94 (ΦΕΚ 16/14.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
7	Κασέρι	ΠΟΠ	313027/11.01.94 (ΦΕΚ 8/11.01.94) 379116/19.07.2000 (ΦΕΚ 949 Β'/31.07.2000) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996 Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L174/2000
8	Κατίκι Δομοκού	ΠΟΠ	313048/14.01.94 (ΦΕΚ 16/14.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
9	Κεφαλογραβιέρα	ΠΟΠ	313032/11.01.94 (ΦΕΚ 8/11.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
10	Κοπανιστή	ΠΟΠ	Προδιαγραφές Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996 Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. C186/2012 Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L129/2013
11	Λαδοτύρι Μυτιλήνης	ΠΟΠ	313058/17.01.94 (ΦΕΚ 25/18.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
12	Μανούρι	ΠΟΠ	313028/11.01.94 (ΦΕΚ 8/11.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
13	Μετσοβόνα	ΠΟΠ	313070/18.01.94 (ΦΕΚ 23/18.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
14	Μπάτζος	ΠΟΠ	313057/17.01.94 (ΦΕΚ 25/18.01.94) 313057/17.01.94 (ΦΕΚ 101 Β'/16.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
15	Ξυνομυζήθρα Κρήτης	ΠΟΠ	313051/14.01.94 (ΦΕΚ 18/14.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
16	Πηχτόγαλο Χανίων	ΠΟΠ	313062/17.01.94 (ΦΕΚ 24/18.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
17	Σαν Μιχάλη	ΠΟΠ	313069/18.01.94 (ΦΕΚ 23/18.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
18	Φέτα	ΠΟΠ	313025/11.01.94 (ΦΕΚ 8/11.01.1994) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L277/2002
19	Σφέλα	ΠΟΠ	313056/17.01.94 (ΦΕΚ 25/18.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
20	Φορμαέλλα Αράχωβας Παρνασσού	ΠΟΠ	313063/17.01.94 (ΦΕΚ 25/18.01.94) Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L148/1996
21	Ξύγαλο Σητείας ή Ξύγαλο Σητείας	ΠΟΠ	Προδιαγραφές Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. C312/2010 Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε. L200/2011
22	<b>Εικόνα 21.</b> Απεικόνιση (α) της συνολικής αξίας πωληθέντων προϊόντων ανά κλάδο Κρφοικονομικής δραστηριότητας και (β) της συνεισφοράς των επιμέρους βιομηχανιών που απαρτίζουν τον κλάδο της Βιομηχανίας Τροφίμων (ΕΛ.ΣΤΑΤ., 2016).		
23	ΑΡΣΕΝΙΚΟ ΝΑΞΟΥ ARSENICO NAXOU	ΠΟΠ	Προδιαγραφές Επίσημη Εφημερίδα ΕΕ L15/20.01.2020 Επίσημη Εφημερίδα ΕΕ C271/13.08.2019



### 1.5.1. Παρασκευή τυριού

«Τυρί είναι το νωπό ή ώριμο προϊόν, που προέρχεται από τη στράγγιση, ύστερα από πήξη του πλήρους, μερικώς αποβουτυρωμένου ή άπαχου γάλακτος ή βουτυρογάλακτος ή μίγματος ορισμένων ή όλων αυτών των προϊόντων.», σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (2011). Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π.) της Ελλάδας, ως τυριά ορίζονται «τα προϊόντα ωρίμανσης του πήγματος (στάλπης) που είναι απαλλαγμένο από το τυρόγαλα στον επιθυμητό κάθε φορά βαθμό και τα οποία παρασκευάστηκαν, με την επενέργεια πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα σε γάλα (νωπό ή παστεριωμένο, αγελάδας, προβάτου, κατσίκας, βουβάλου και μίγματα αυτών) ή σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή σε μίγμα αυτών ή/και σε μίγματα αυτών με κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα).»

#### ▪ Πρώτες ύλες

Οι βασικές πρώτες ύλες, για την παρασκευή των τυριών είναι το γάλα, ο πηκτικός παράγοντας, η οξυγαλακτική καλλιέργεια και το αλάτι. Στην ελληνική τυροκομία χρησιμοποιούνται, ως επί το πλείστο, το αιγοπρόβειο και το αγελαδινό γάλα. Η πήξη του γάλακτος γίνεται μέσω πηκτικών ενζύμων. Η εμπορική πυτιά, με χυμοσίνη σε περιεκτικότητα μεγαλύτερη του 90% και προέλευση ζωική, από τον ήνυστρο μικρών μηρυκαστικών, αποτελεί το κύριο μέσω πήξης. Στα περισσότερα είδη τυριών λαμβάνει χώρα ζύμωση, από πληθυσμούς βακτηρίων και μυκήτων. Η γαλακτική ζύμωση πραγματοποιείται από οξυγαλακτικά βακτήρια, ενώ η προπιονική από είδη του γένους *Propionibacterium*. Οι σημαντικότεροι αντιπρόσωποι για τις εναρκτήρες και τις δευτερεύουσες καλλιέργειες είναι είδη από τα γένη *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Propionibacterium*. Από το βασίλειο των μυκήτων, ευρείας χρήσης είναι είδη του γένους *Penicillium*, όπως τα είδη *P. roqueforti* και *P. camemberti*, για επιφανειακή ανάπτυξη. Ο ρόλος του αλατιού άπτεται στην αποβολή της υγρασίας του τυροπήγματος και τη συντήρηση του τυριού, αναστέλλοντας της ανάπτυξη αλλοιογόνου μικροχλωρίδας (Μάντης, 2015). Στις πρόσθετες ύλες υπάγεται το χλωριούχο ασβέστιο, το οποίο βοηθάει στην πήξη του γάλακτος με ένζυμα, λόγω των ιόντων ασβεστίου, που συνεισφέρουν στο σχηματισμό της δομής του τρισδιάστατου πλέγματος του τυροπήγματος, όπως, επίσης, και διάφορες χρωστικές (ροβοφλαβίνη, χλωροφύλλη), συντηρητικά, σταθεροποιητές,

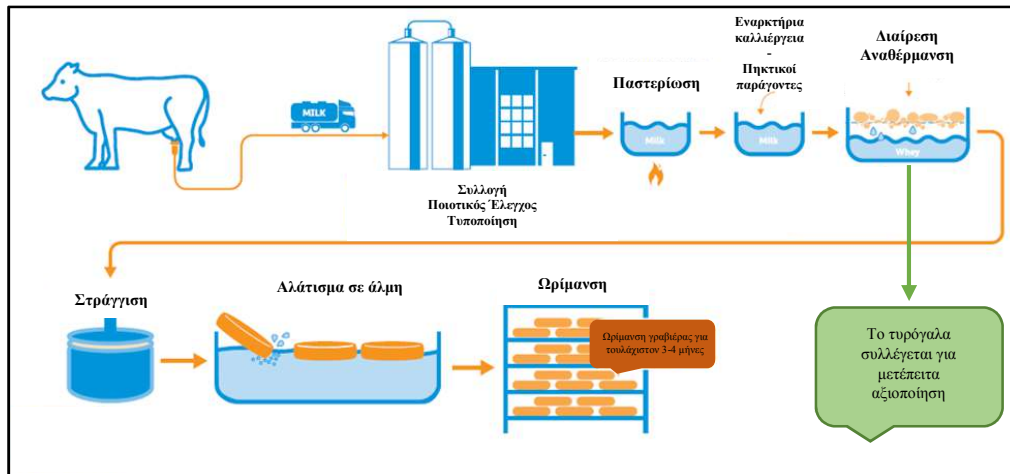
γαλακτωματοποιητές, διάφορα οξέα ως μέσα οξίνισης και βελτιωτικά γένυσης σε συγκεκριμένες περιπτώσεις τυριών (Μάντης, 2015).

#### ▪ **Στάδια παρασκευής**

Το γάλα, που προορίζεται για τυροκόμηση, υποβάλλεται σε ποιοτικό έλεγχο, για να διαπιστωθεί η καταλληλότητά του. Οι παράμετροι που ελέγχονται αρχικά είναι η παρουσία αντιβιοτικών και αφλατοξινών, ενώ παράλληλα ελέγχεται η οξύτητα (μέτρηση pH), η λιποπεριεκτικότητα, το στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (Σ.Υ.Α.Λ.) και η μικροβιολογική ποιότητα. Στις περισσότερες των περιπτώσεων το γάλα υφίσταται παστερίωση, με σκοπό το τυρί να είναι απαλλαγμένο από ζωνοσούς. Εξαιρούνται κάποια τυριά που παρασκευάζονται από νωπό γάλα, όμως λόγω μακράς ωρίμανσης, το τυρί υφίσταται «αυτό-εξυγίανση». Η παστερίωση αντιστοιχεί σε διάφορους συνδυασμούς θερμοκρασίας και χρονικής περιόδου, στην οποία πρέπει να παραμείνει το γάλα. Οι πλέον κοινές είναι η παραμονή σε θερμοκρασία 62-65 °C για 30 λεπτά (Low Temperature Long Time Pasteurization, L.T.L.T.) και η παραμονή σε θερμοκρασία 72 °C περί τα 15 δευτερόλεπτα (High Temperature Short Time Pasteurization, H.T.S.T.). Κατά την παστερίωση δεν καταστρέφονται τα σπόρια των βακτηρίων (*Clostridium* spp, *Bacillus* spp.), με τις μεγάλες γαλακτοβιομηχανίες να επεξεργάζονται το γάλα συμπληρωματικά και πριν την παστερίωση, με φυγοκέντρηση, σε μια επεξεργασία γνωστή ως βακτηριοκάθαρση (bactofugation). Μετά το πέρας της παστερίωσης, στο γάλα εμβολιάζεται η κατάλληλη ποσότητα οξυγαλακτικής καλλιέργειας, όταν αυτό αποκτήσει θερμοκρασία περί τους 35 °C. Τα περισσότερα τυριά είναι προϊόντα πήξης του γάλακτος εν τη παρουσία πηκτικού ενζύμου, συνήθως εμπορική πυτιά, με περιεκτικότητα σε χυμοσίνη μεγαλύτερη του 90%, διαδικασία αποκαλούμενη και ως «γλυκιά» πήξη. Το πηκτικό ένζυμο δρα μόνο στις πρωτεΐνες καζεΐνες και κυρίως στην κ-καζεΐνη και όχι στις πρωτεΐνες του ορού. Η δράση του ενζύμου στην προαναφερθείσα πρωτεΐνη οδηγεί, σε πρώτη φάση, στην αποσταθεροποίηση των καζεϊνικών μικκυλίων. Σε επόμενη φάση, η παρουσία των ιόντων ασβεστίου, τα οποία συνήθως ενισχύονται εξωγενώς με την προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου (CaCl<sub>2</sub>), συνεισφέρουν στο σχηματισμού του πρωτεϊνικού παρα-καζεϊνικού πλέγματος, στο εσωτερικό του οποίου εγκλείεται το λίπος, δίδοντας το τελικό πήγμα. Οι οροπρωτεΐνες δεν επηρεάζονται από την ενζυμική αντίδραση, παραμένουν υδατοδιαλυτές και απομακρύνονται στον ορό του γάλακτος, το αποκαλούμενο τυρόγαλα, κατά τη στράγγιση του τυροπήγματος. Το ίδιο συμβαίνει

και με το μεγαλύτερο ποσοστό της λακτόζης. Πέραν της «γλυκιάς» πήξης, σε ορισμένες περιπτώσεις εφαρμόζεται «όξινη» πήξη, που πραγματοποιείται λόγω της προσθήκης μεγάλης ποσότητας οξυγαλακτικής καλλιέργειας ή οξέος στο γάλα (λ.χ. γαλακτικό, οξικό), απόρροια της οποίας είναι η μείωση του pH και η κατακρήμνιση του καζεϊνικού πλέγματος στο ισοηλεκτρικό του σημείο,  $pI=4,6$  (Μάντης, 2015).

Η ποσότητα της υγρασίας, που θα παραμείνει στο τελικό προϊόν και θα διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην κατηγοριοποίησή του (ως μαλακό, ημίσκληρο, σκληρό, πολύ σκληρό τυρί), καθορίζεται από το μέγεθος κατά τη διαίρεση του τυροπήγματος, την εφαρμογή αναθέρμανσης, την ένταση της μηχανικής πίεσης κατά τη στράγγιση, την οξύτητα και το αλάτισμα. Σε διάστημα 30 λεπτών μετά την προσθήκη της πυτιάς, το γάλα έχει πήξει και, ανάλογα το τυρί που θα παρασκευαστεί, το πήγμα διαιρείται με ειδικούς τυροκόπτες. Όσο μικρότερο το μέγεθος των τεμαχιδίων, τόσο ενισχύεται η συναίρεση του ορού, λόγω αύξησης της επιφάνειας διαφυγής και μείωσης της απόστασης από το κέντρο. Όσο το pH μειώνεται, το παρακαζεϊνικό πλέγμα αποβάλλει περισσότερο τυρόγαλα. Το ίδιο συμβαίνει κατά την αργή αναθέρμανση υπό συνεχή ανάδευση του τεμαχισμένου πήγματος. Το τυρόπηγμα μεταφέρεται, εν συνεχεία, σε ειδικές μήτρες (καλούπια), παρουσία ή μη τυρόπανου (τσαντίλας) για να υποστεί στράγγιση, με ή χωρίς μηχανική πίεση (διαφορετικής έντασης, ανάλογα με το αποσκοπούμενο τελικό αποτέλεσμα), αναστροφές και αλλαγές τυρόπανων. Η αλάτιση περιλαμβάνει υγρό ή ξηρό αλάτισμα, εμβάπτιση σε άλμη ή προσθήκη άλατος στο γάλα. Μετά το πέρας της παρασκευαστικής διαδικασίας, ακολουθεί η ωρίμανση στις περιβαλλοντικές συνθήκες και το χρονικό διάστημα, που απαιτεί το κάθε τυρί (Μάντης, 2015) (Εικόνα 21).



**Εικόνα 22.** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παρασκευής γραβιέρας (τροποποιημένο από [www.frieslandcampinainstitute.com](http://www.frieslandcampinainstitute.com)).

Τα τυριά διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες, με τα χαρακτηριστικά, τα οποία τα διαχωρίζουν να προέρχονται από το γάλα που χρησιμοποιείται, τη θερμική ή/και μηχανική επεξεργασία που εφαρμόζεται, τη μικροβιακή χλωρίδα των εναρκτηρίων και δευτερευουσών καλλιιεργειών και τη διαδικασία της ωρίμανσης, με τις φυσικοχημικές και περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στις αίθουσες ωρίμανσης. Η φέτα, η ναυαρχίδα της ελληνικής τυροκομίας από πλευράς πωλήσεων και το πλέον φημισμένο ελληνικό τυρί παρασκευάζεται από αιγοπρόβειο γάλα, με το αίγιο να μην χαρακτηρίζεται ως τυρί άλμης, λόγω του μεγάλου διαστήματος που ωριμάζει σε αυτή, με υψηλή υγρασία και οξύτητα. Ημίσκληρα τυριά όπως το Camembet, το Roquefort, η Gorgonzola και το Blue Cheese ωριμάζουν με την παράλληλη ανάπτυξη μυκήτων, επιφανειακά στην περίπτωση του πρώτου και κυρίως στο εσωτερικό του τυροπήγματος για τα υπόλοιπα μπλε τυριά. Ημίσκληρα τυριά φιλαρίσματος, με πλαστική μάζα ή αλλιώς pasta filata, προκύπτουν από την έντονη μηχανική κατεργασία της μάζας του φρέσκου, μη-αλατισμένου τυριού σε θερμό νερό ή τυρόγαλα (70-80 °C), με αποτέλεσμα την πλαστική και εύπλαστη τυρομάζα, που αφήνεται να ωριμάσει. Τα τυριά όπως το Emmental ανήκουν στην κατηγορία των σκληρών τυριών, κατηγορία που προϋποθέτει την αναθέρμανση του τεμαχισμένου τυροπήγματος, ενώ χαρακτηρίζονται και ως τυριά Ελβετικού τύπου, λόγω της ανάπτυξης δευτερογενούς καλλιιεργείας προπιονικών βακτηρίων, η βιολογική απόκριση των οποίων οδηγεί στις χαρακτηριστικές λείες σχετικά μεγάλες οπές στη μάζα του τυριού. Αντίστοιχα, στα σκληρά τυριά Ολλανδικού τύπου, όπως το Gouda, πραγματοποιείται «πλύσιμο του πήγματος», με αντικατάσταση του τυρογάλακτος με νερό, χρήση μεσόφιλων καλλιιεργειών και σχηματισμό σποραδικών οπών στο τυρί.

Χαρακτηριστικά σκληρά τυριά αναθέρμανσης με διάρκεια ωρίμανσης μεγαλύτερη των 3 μηνών και μεγάλη διάρκεια ζωής είναι η Γραβιέρα, το Κεφαλοτύρι, η κεφαλογραβιέρα και το Cheddar. Πολύ σκληρά τυριά, όπως η Παρμεζάνα και το Σαν Μιχάλη (σκληρό τυρί σύμφωνα με τα κριτήρια του Codex Alimentarius) υπόκεινται σε έντονη αναθέρμανση παρουσία θερμοφίλων καλλιιεργειών. Η διάρκεια ωρίμανσης είναι μεγάλη, αποδίδοντας στην παρμεζάνα μεγάλη διάρκεια ζωής και δίδοντας τη δυνατότητα στους παραγωγούς να την παρασκευάζουν από νωπό γάλα (Μάντης, 2015).

**Πίνακας 3.** Κατηγοριοποίηση των τυριών ως προς την περιεκτικότητα σε υγρασία, σύμφωνα με τον Codex Alimentarius και τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων & Ποτών (Μοάτσου, Γ., Διαλέξεις μαθήματος “Ειδική Τυροκομία”, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Γ.Π.Α.).

Σήμανση / Κατηγορία	Codex Alimentarius, FAO/WHO	Ελληνικός ΚΤΠ		
	Υγρασία επί των μη-λιπαρών συστατικών, % (MNFS) *	Μέγιστη υγρασία, %	Ελάχιστο λίπος επί ξηρού, % (ΛΞ, FDM) **	Ελάχιστη διάρκεια ωρίμανσης (μήνες)
Πολύ σκληρά	<51	32	45	3
Σκληρά	49-56	38	40	3
Ημίσκληρα/Σφικτά	54-69	46	40	3
Μαλακά	>67	58	35	2

Η απόδοση σε ποσότητα τυριού εξαρτάται από τα στερεά συστατικά του γάλακτος και κυρίως από την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες καζεΐνες και τη λιποπεριεκτικότητα, η οποία είναι και ο κυρίαρχος ρυθμιστής της τιμής πώλησης του γάλακτος, από τον παραγωγό. Η λακτόζη, αν και σημαντικό κλάσμα των στερεών, δε συμμετέχει δομικά στο πήγμα, με το μεγαλύτερο ποσοστό να διαφεύγει στο τυρόγαλα, ένας μέρος της, όμως, ζυμώνεται από την ενυπάρχουσα βακτηριακή μικροχλωρίδα, παράγοντας γαλακτικό και λοιπά οργανικά οξέα, ρυθμίζοντας το pH του γάλακτος κατά την τυροκόμηση και του σχηματιζόμενου πηγματος αλλά και προσδίδοντας ιδιαίτερους χαρακτήρες στο τελικό προϊόν. Το παραπροϊόν της τυροκομίας είναι το (πρωτογενές) τυρόγαλα (Εικόνα 22), ένα υγρό πλούσιο στα υδατοδιαλυτά συστατικά λακτόζη, πρωτεΐνες του ορού, άλατα και περιεκτικότητα ύδατος περί το 94%.



**Εικόνα 23.** Συλλογή του ορού του γάλακτος (πρωτογενές τυρόγαλα) κατά τη στράγγιση του τυροπήγματος σε ειδικά καλούπια παρασκευής φέτας (Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Γ.Π.Α.).

### **1.5.2. Αξιοποίηση του πρωτογενούς τυρογάλακτος**

Το τυρόγαλα είναι ένα χρυσο-πράσινο υγρό, που παράγεται από την πρώτη στιγμή που παρασκευάστηκε τυρί. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, όπου προέρχεται από τυροκόμηση με πυτιά, αποκαλείται «γλυκό τυρόγαλα» με  $pH=5,9-6,6$ , ενώ στις περιπτώσεις όξινης πήξης, χαρακτηρίζεται ως «όξινο τυρόγαλα», λόγω του  $pH=4,3-4,6$ . Η ποσότητα του τυρογάλακτος που αποβάλλεται κατά τη στράγγιση ενός τυροπήγματος, είναι ανάλογη του είδους του γάλακτος που χρησιμοποιείται και της παραγωγικής διαδικασίας του τυριού που θα παραχθεί. Το αιγοπρόβειο γάλα είναι πιο πλούσιο σε στερεά συστατικά, άρα απαιτείται λιγότερη ποσότητα γάλακτος για την παρασκευή ενός τυριού από αιγοπρόβειο γάλα (λ.χ. 6,5-6,9 kg γάλακτος ανά κιλό Γραβιέρας Κρήτης), σε σχέση με ένα τυρί που παρασκευάζεται με αγελαδινό κυρίως γάλα (λ.χ. 10-12,5 kg γάλα ανά κιλό Γραβιέρας Νάξου). Επίσης, ένα μαλακό τυρί,



όπως η φέτα, δεν πρέπει να αποβάλει πολύ υγρασία, σε σχέση με ένα σκληρό τυρί. Για την παρασκευή ενός κιλού φέτας, απαιτούνται περί τα 4 kg αιγοπρόβειου γάλακτος, ενώ για την παρασκευή ενός κιλού σκληρού τυριού, όπως το κεφαλοτύρι, απαιτούνται περί τα 7 kg αιγοπρόβειου γάλακτος. Όσο πιο σκληρό το τυρί, τόσο περισσότερος ο ορός που θα αποβληθεί. Η διαφορά στην ποσότητα γάλακτος που απαιτείται για την παρασκευή του εκάστοτε τυριού σε σχέση με την ποσότητα του τυριού που παράγεται, αντιστοιχεί στην ποσότητα του τυρογάλακτος που αποβάλλεται. Στην περίπτωση της Γραβιέρας Νάξου, που έχει χρησιμοποιηθεί 80% αγελαδινό και 20% αιγοπρόβειο γάλα και απαιτήθηκαν 10 kg αυτών αθροιστικά, η ποσότητα του ορού που αποβάλλεται είναι περί τα 9 kg, ενώ για την περίπτωση της φέτας είναι σαφώς μικρότερη (περίπου 3 kg) (Μασσούρας, Διαλέξεις μαθήματος “Ειδική Τυροκομία”, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Γ.Π.Α.).

Παγκοσμίως, η ποσότητα του τυρογάλακτος υπολογίζεται περί τους 180-190 εκατομμύρια τόνους, ετησίως, με το 50% αυτού να επεξεργάζεται, παράγοντας νέα προϊόντα, για τη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων, ενώ εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης παράγονται 40 εκατομμύρια τόνοι, με ένα ποσοστό της τάξης του 33%, ήτοι 13 εκατομμύρια τόνοι, που περιέχουν 619.250 τόνους λακτόζη, να απορρίπτονται. (Mollea *et al.*, 2012). Όταν η τυροκομία βρισκόταν ακόμη σε οικοτεχνικό επίπεδο, οι ποσότητες αυτού ήταν μικρές και συνήθως ενίσχυε τα σιτηρέσια των ζώων του αγροκτήματος και, συνήθως, των χοίρων. Με την πάροδο των ετών, τόσο η χοιροτροφία, όσο και η αγελαδοτροφία αναπτύχθηκαν, ξεχωριστά, σε μεγάλες μονάδες εντατικής εκτροφής. Η παραγωγή του τυρογάλακτος αυξήθηκε με την παράλληλη αύξηση της παραγωγής τυριών και η διαχείρισή του έγινε ολοένα και δυσκολότερη. Οι όποιες απόπειρες μεταφοράς του σε μονάδες χοιροτροφίας αποδείχθηκαν οικονομικά ασύμφορες. Η εύκολη, αλλά συνάμα παράνομη και κατακριτέα λύση, ειδικά σε περιπτώσεις επαρχιακών τυροκομείων, μικρής και μεσαίας παραγωγικής δυναμικότητας, ήταν η απόρριψη σε υδάτινους συλλέκτες, όπως σε λίμνες ή ποτάμια και στη θάλασσα. Ένα απόβλητο τόσο υψηλού οργανικού φορτίου, σύντομα οδήγησε τους αποδέκτες σε ανεπάρκεια οξυγόνου, λόγω φαινομένων ευτροφισμού και οξείδωσης των οργανικών ενώσεων, με το θάνατο των έμβιων όντων να επέρχεται ως φυσικό επακόλουθο, μαζί με έντονη δυσοσμία (Ανυφαντάκης, 2004). Το υψηλό οργανικό φορτίο αφορά κυρίως την υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη και σε δυσκόλως βιοδιασπώμενες πρωτεΐνες, με το

χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, C.O.D.) να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 50.000-80.000 mg/L και το βιολογικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Biological Oxygen Demand, B.O.D.) από 40.000 έως 60.000 mg/L (Chatzipaschali *et al.*, 2012; Lappa *et al.*, 2019).

Η καταστροφική για το περιβάλλον αυτή λύση σύντομα κρίθηκε ανεπαρκής, οπότε η βιομηχανία, σε συνεργασία με την επιστημονική κοινότητα, στράφηκε σε νέες λύσεις για την επεξεργασία ενός παραπροϊόντος ευτελούς αξίας, που όμως τις επιβάρυνε σοβαρά, από οικονομικής και οικολογικής σκοπιάς. Με το τυρόγαλα αποβάλλεται το 50-55% των στερεών του γάλακτος (Chatzipaschali *et al.*, 2012; Lappa *et al.*, 2019), με κυριότερο αυτών τη λακτόζη συγκέντρωσης 46-52 g/L και τις πρωτεΐνες με συγκέντρωση 6-10 g/L να έπονται, μετά από γλυκιά πήξη. Στην περίπτωση του όξινου ορού, ο καταβολισμός της λακτόζης προς γαλακτικό οξύ, μειώνει τα επίπεδα της πρώτης (44-46 g/L), αυξάνοντας τα επίπεδα του οξέος στον όξινο ορό (6,4 g/L) (Πίνακας 4). Η περιεκτικότητα σε νερό είναι της τάξεως του 93-94% (v/v). Η τελική σύσταση του τυρογάλακτος δεν εξαρτάται μόνο από το είδος της πήξης, αλλά και από το γάλα που χρησιμοποιείται και την όλη παραγωγική διαδικασία τυροκόμησης, οπότε οι συγκεντρώσεις που καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα είναι ευμετάβλητες.

**Πίνακας 4.** Τυπική σύσταση του τυρογάλακτος από γλυκιά και όξινη πήξη (Chatzipaschali *et al.*, 2012).

Components	Sweet whey (g/L)	Acid whey (g/L)
Total solids	63–70	63–70
Lactose	46–52	44–46
Proteins	6–10	6–8
Calcium	0.4–0.6	1.2–1.6
Phosphate	1–3	2–4.5
Lactate	2	6.4
Chloride	1.1	1.1

Τα τελευταία 50 χρόνια άλλαξε άρδην η διαχείριση του τυρογάλακτος, κυρίως στις μεγάλες βιομηχανίες, παγκοσμίου βεληνεκούς. Η τεχνολογία μεμβρανών έδωσε τη δυνατότητα αξιοποίησης αυτού του πλούσιου σε πρωτεΐνες, σάκχαρα και άλατα υγρού, που κάθε άλλο παρά απόβλητο θα πρέπει να νοείται (Μαντής, 2015). Από τους περίπου 95 εκατομμύρια τόνους, που επεξεργάζονται σήμερα, το 50% αντιστοιχεί στην αξιοποίησή του σε υγρή μορφή, 30% αφορά την σκόνη τυρογάλακτος, 15% αξιοποιείται για την απομόνωση λακτόζης και το υπόλοιπο αφορά τα συμπυκνώματα και τις σκόνες των πρωτεϊνών του ορού, που λειτουργούν

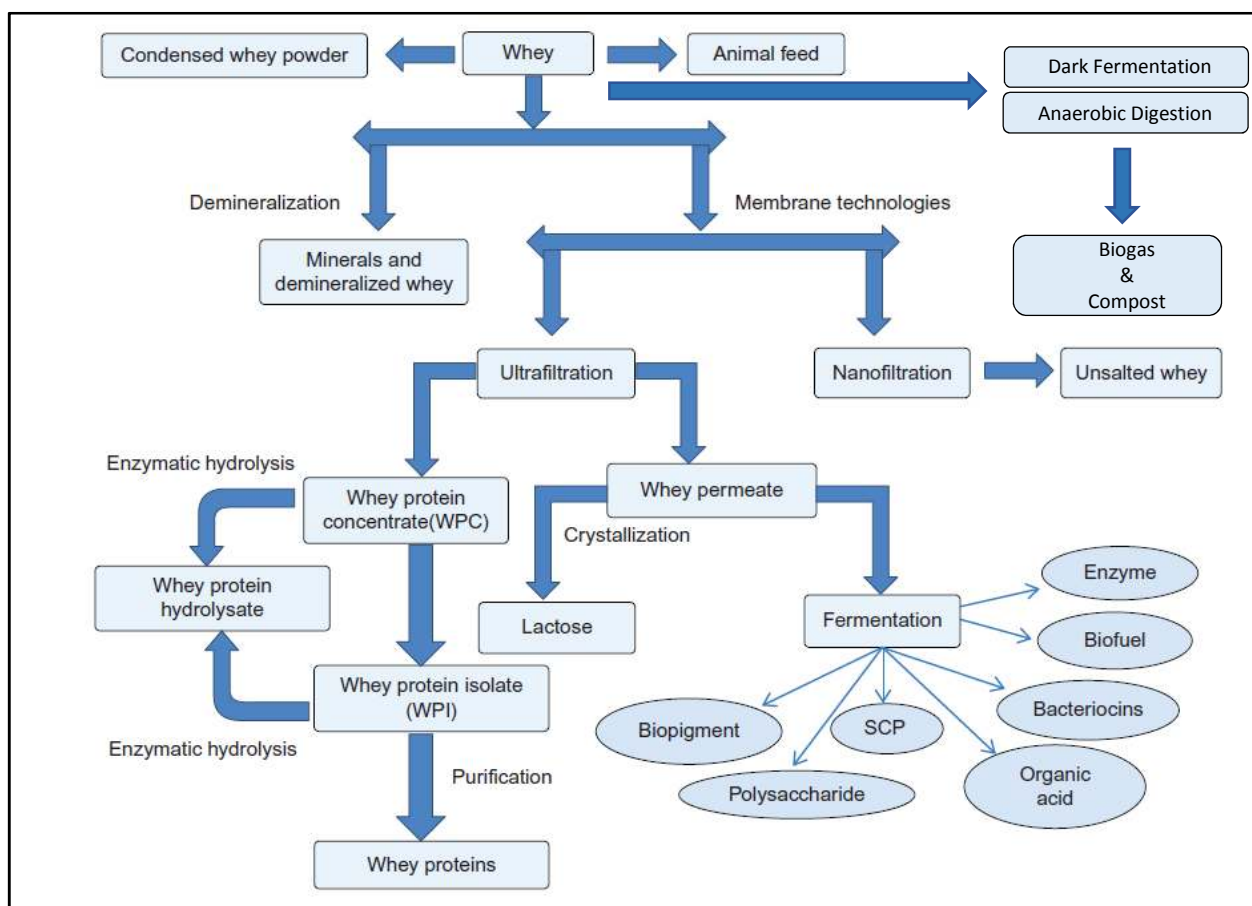
ως συμπληρώματα διατροφής, ενώ αξιοποιούνται και στην παρασκευή διαφόρων τροφίμων (πχ γιαούρτη) (Mollea *et al.*, 2012).

Οι προσεγγίσεις, που χρησιμοποιούνται για την αποτελεσματική μείωση του οργανικού φορτίου του αποβλήτου είναι 2 ειδών και αφορούν α) την εφαρμογή φυσικοχημικών μεθόδων, όπως η θέρμανση, η καθίζηση και η εφαρμογή τεχνικών διήθησης με μεμβράνες, για ανάκτηση των στερεών κλασμάτων και β) χημικές τεχνικές και βιοτεχνολογική εφαρμογή μικροβιακών πληθυσμών για την παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας και τη βιοαποκατάσταση του τυρογάλακτος, που είναι ο πρωταρχικός στόχος (Mawson, 1994). Όπως αναλύθηκε πρότερα, η σύσταση του τυρογάλακτος είναι ευμετάβλητη, όπως επίσης και η ποσότητα που παράγεται ανά περιοχή. Ο τρόπος με τον οποίο θα επεξεργαστεί ή/και θα αξιοποιηθεί σε επίπεδο βιομηχανίας, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα σε καθημερινή βάση, η επένδυση και το κόστος της επεξεργασίας, η απορροφησιμότητα του τελικού προϊόντος από την αγορά, το επιστημονικό δυναμικό και η τοποθεσία της βιομηχανίας. Από τα άνωθεν γίνεται αντιληπτό ότι η επεξεργασία του τυρογάλακτος ανά περίπτωση προϋποθέτει εξατομίκευση και, κυρίως, συνδυασμό φυσικοχημικών και βιολογικών μεθόδων επεξεργασίας, ενός ή/και περισσότερων σταδίων, όπως θα αναλυθούν συνοπτικά, κάτωθι (Εικόνα 23).

#### ▪ Ζωοτροφή

Η χρήση του τυρογάλακτος ως ζωοτροφή αποτέλεσε έναν εκ των πρώτων τρόπων απαλλαγής των οικοτεχνιών και βιοτεχνιών απ' αυτό. Η ορθή αξιοποίησή του στο σιτηρέσιο των χοίρων είχε θετικό αντίκτυπο στην ανάπτυξή τους, λόγω της υψηλής πρωτεϊνοπεριεκτικότητας. Ο εμπλουτισμός της ζωοτροφής με τυρόγαλα πρέπει να γίνεται σταδιακά, ειδάλως προκαλεί πεπτικές διαταραχές. Συνήθως καταναλώνεται από παχυνόμενα χοιρίδια και κυοφορούσες χοιρομητέρες, λόγω των αναγκών των και του οικονομικού αντίκτυπου. Στην περίπτωση των μηρυκαστικών το τυρόγαλα μπορεί να αντικαταστήσει μερικώς ή ολικώς την πρόσληψη νερού, αρκεί να καταναλώνεται η ενδεδειγμένη ποσότητα, ώστε να μην προκληθούν παρενέργειες. Το γλυκό τυρόγαλα είναι πιο ελκυστικό για το ζώο, οπότε καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες, ενώ το όξινο σε σαφώς μικρότερες. Η ύπαρξη εγκαταστάσεων αποθήκευσης και διανομής του υγρού τυρογάλακτος είναι αναγκαία. Παράλληλα, το κύριο μειονέκτημα στην αξιοποίηση του τυρογάλακτος ως ζωοτροφή, είναι η έλλειψη

γνώσεων των παραγωγών ως προς το σιτηρέσιο και τις ποσότητες που πρέπει να καταναλώσει το κάθε ζώο. Οι δεξαμενές αποθήκευσης, το δίκτυο διανομής και το σύστημα εκροής πρέπει να είναι από ανοξείδωτο υλικό (ανοξείδωτο χάλυβα, inox) και να καθαρίζεται μετά από κάθε χρήση για αποφυγή επικαθήσεων. Όταν χορηγείται σκόνη τυρογάλακτος, δεν απαιτούνται τα προηγούμενα, καθώς ενσωματώνεται στο μίγμα ζωοτροφής, όπως κάθε άλλο στερεό συστατικό αυτού (Ανυφαντάκης, 2004).

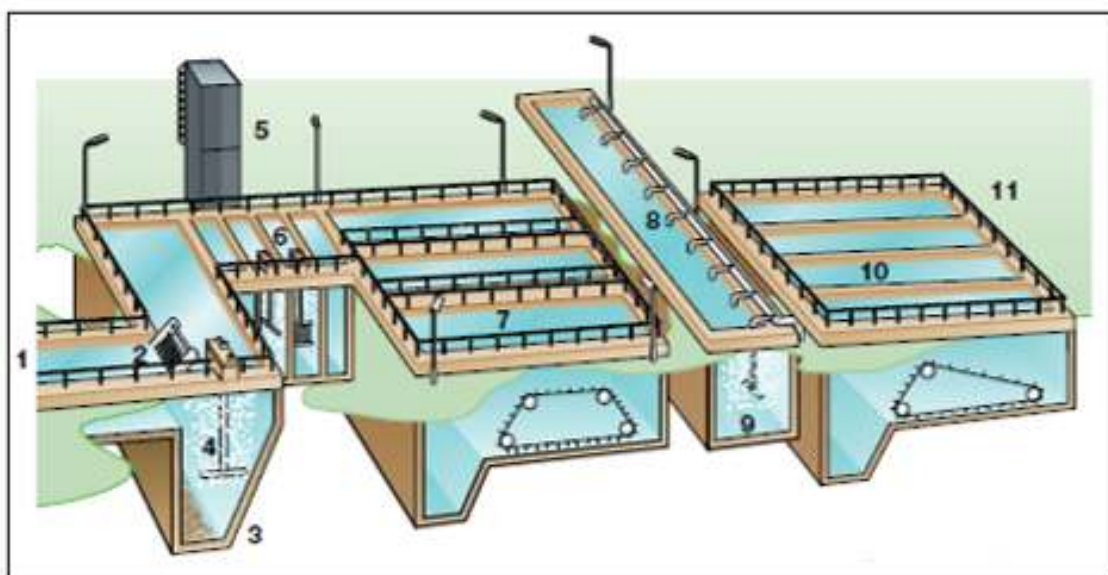


**Εικόνα 24.** Γενική επισκόπηση των κλασμάτων, που προκύπτουν κατά την επεξεργασία του τυρογάλακτος και των προϊόντων προστιθέμενης αξίας που δύνανται να προκύψουν (τροποποιημένο από Kaur *et al.*, 2020).

#### ▪ **Αερόβια Επεξεργασία & Αναερόβια Χώνευση**

Τη δεκαετία του 1970 ξεκίνησε η εφαρμογή αερόβιων διεργασιών για την επεξεργασία των λυμάτων, όπως είναι η ενεργοποιημένη ιλύς και η αποθήκευση σε δεξαμενές υπό συνεχή αερισμό, σε συνδυασμό με τεχνικές εσχαρισμού, διήθησης σε άμμο (παγίδα άμμου) και καθίζησης. Τα απόβλητα υφίστανται μηχανική, χημική και βιολογική επεξεργασία, για τη μείωση των στερεών. Καθώς τα απόβλητα εισέρχονται στη μονάδα (1), πραγματοποιείται εσχαρισμός σε ειδικά φίλτρα (2), για την

απομάκρυνση των μεγάλων στερεών και εν συνεχεία στην παγίδα άμμου (3), υπό συνεχή ανάδευση και αερισμό (4), η άμμος ανακατεύεται με τα βαριά σωματίδια και όλα μαζί καθιζάνουν. Στα υδατοδιαλυτά και τα ελαφρύτερα του νερού στερεά, όπως το λίπος προστίθενται χημικοί παράγοντας κροκκίδωσης σε συνθήκες έντονης ανάδευσης (5) με στόχο την απομάκρυνση του φωσφόρου, τα αδιάλυτα άλατα του οποίου καθιζάνουν στις δεξαμενές προ-κατακρίμισης (6) και προ-καθίξεσης (7). Το υγρό που εξέρχεται των δεξαμενών αυτών οδεύει προς βιολογική επεξεργασία, με την τεχνική της ενεργούς ιλύος (8) και συνεχή αερισμό (9). Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί αξιοποιούν της οργανικές ουσίες του λύματος και αυξάνουν τη βιομάζα τους. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί ανακυκλώνονται κατά την εκροή του τελικού ρεύματος (11) και η λάσπη που έχει καθιζάνει στις κύριες δεξαμενές καθίξεσης (10) οδηγείται προς πάχυνση (πύκνωση) και ξήρανση (Εικόνα 24) (Gösta Bylund, Tetra Pak, 1995).



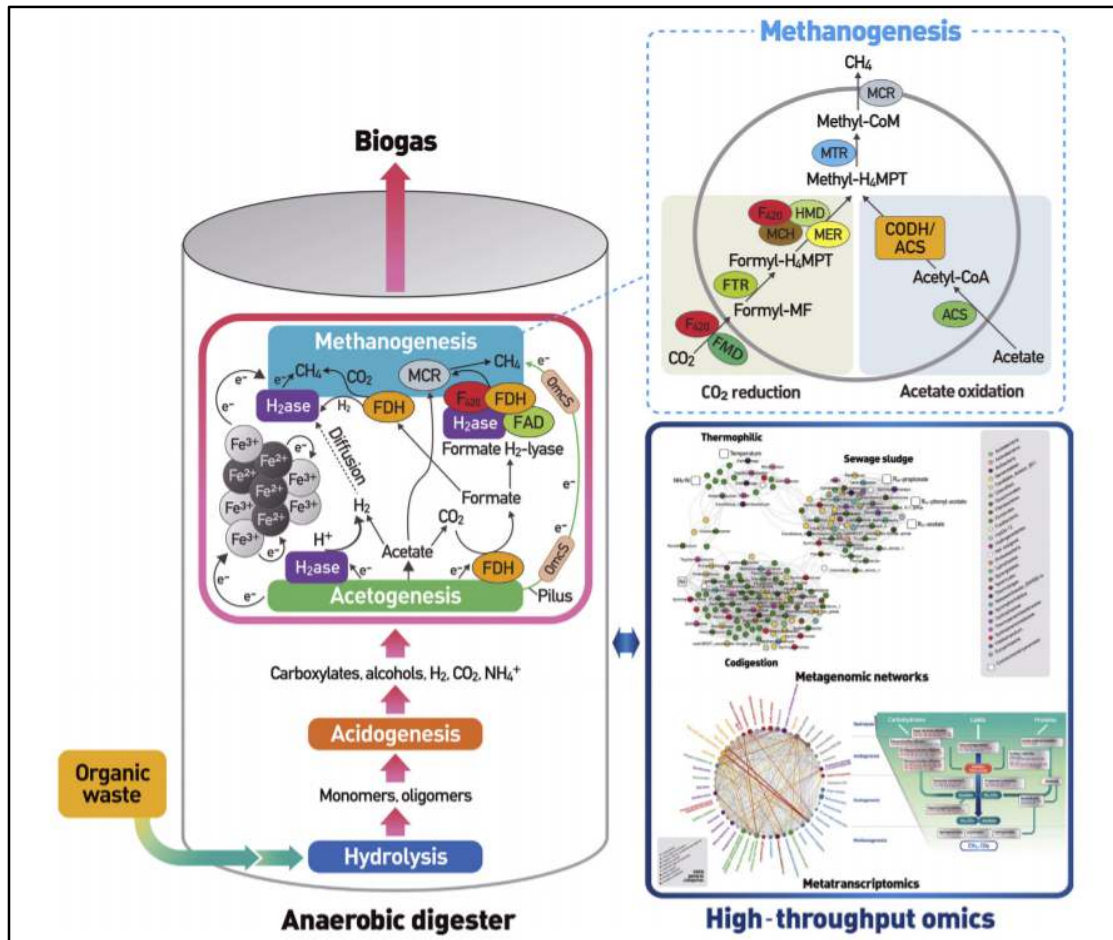
**Εικόνα 25.** Απεικόνιση των διαφορετικών σταδίων μιας μονάδας επεξεργασίας λυμάτων (Dairy processing handbook, Tetra Pak, 1995).

Η διαδικασία, που μόλις περιεγράφηκε, άρχισε σύντομα να εμφανίζει μειονεκτήματα που αφορούν τη διαθεσιμότητα και χωρητικότητα των δεξαμενών, τον μεταβαλλόμενο όγκο και σύσταση των αποβλήτων, τις ενεργειακές απαιτήσεις σε οξυγόνο, τη μεγάλη ποσότητα λάσπης και τις δυσκολίες καθίξεσης και πάχυνσης αυτής. Στα μέσα της δεκαετίας του ογδόντα, η αναερόβια χώνευση αναπτύχθηκε, με στόχο την απορρύπανση του φορτίου, παράγοντας βιοαέριο, το οποίο αξιοποιείται ως εναλλακτική πηγή ενέργειας. Η χώνευση του τυρογάλακτος ή μίγματος αυτού με άλλα παραπροϊόντα πραγματοποιείται σε μεσόφιλες συνθήκες (35-37 °C), εν τη

απουσία οξυγόνου και αποτελεί μια πολύπλοκη μεταβολική διαδικασία με διακριτές και διαδοχικές φάσεις υδρόλυσης, οξεογένεσης, οξικογένεσης και μεθανογένεσης (Prazeres *et al.*, 2012; Shouvik *et al.*, 2020).

Στο πρώτο στάδιο υδρολύονται τα οργανικά πολυμερή (πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιπίδια) προς σχηματισμό ολίγο- και μονομερών. Ο ρυθμός υδρόλυσης καθορίζει την ταχύτητα της αναερόβιας χώνευσης, καθώς αυτή καθορίζει τη διαθεσιμότητα υποστρώματος για τα επόμενα στάδια. Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν και παράγουν υδρολυτικά ένζυμα όπως πρωτεάσες, λιπάσες, κυτταρινάσες, β-γλυκοσιδάση ανήκουν στα γένη *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Fusobacterium*, *Hydrogenoanaerobacterium*, *Paraclostridium*, *Anaerosalibacter*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Micrococcus* και *Lachnoclostridium*. Στο στάδιο της οξεογένεσης, τα σάκχαρα και τα αμινοξέα ζυμώνονται προς οξέα όπως οξικό, προπιονικό, βουτυρικό και άλλα οξέα μικρής αλύσειας, αλλά και αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη), ενώ παράγεται και CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>, από μικροοργανισμούς των γενών *Clostridium*, *Bacillus*, *Tissierella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Hydrogenoanaerobacterium*, *Paraclostridium*, *Prevotella*, *Eubacterium*, και *Lachnoclostridium*. Τα λιπαρά οξέα μεγάλης αλύσειας (L.C.F.A.) καταβολίζονται μέσω β-οξειδωσης προς σχηματισμό ενώσεων C<sub>2</sub> (ενώσεις με 2 άτομα άνθρακα), όπως το μίγμα οξικού οξέος με H<sub>2</sub>, κατά το στάδιο της οξικογένεσης, από μικροοργανισμούς των οικογενειών Clostridiaceae, Syntrophomonadaceae, Syntrophaceae, Enterobacteriaceae και Bacteroidia. Όλα τα μεταβολικά προϊόντα των 2 προηγούμενων σταδίων χρησιμεύουν ως υποστρώματα για τη μεθανογένεση και την παραγωγή CH<sub>4</sub>, από μεθανοπαραγωγά αρχαία, με το μεθάνιο μαζί με το CO<sub>2</sub> να αποτελούν το παραγόμενο βιοαέριο (Εικόνα 25) (Shouvik *et al.*, 2020).





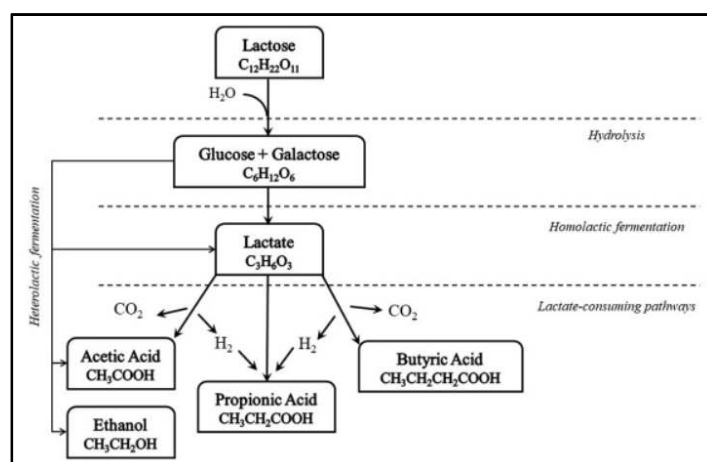
Εικόνα 26. Απεικόνιση των 4 σταδίων που συνυπάρχουν κατά την αναερόβια χώνευση (Shouvik *et al.*, 2020).

Η αξιοποίηση του τυρογάλακτος προς παραγωγή βιοαερίου και κατ' επέκταση ηλεκτρικής ενέργειας και θερμότητας είναι αρκετά διαδεδομένη στην Ευρώπη, με τη Γερμανία να κρατάει τα ηνία με 10.849 μονάδες βιοαερίου, από τις 17.662, που υπάρχουν στη γηραιά ήπειρο, με συνολική εγκατεστημένη ισχύ 9.985 MW (European Biogas Association, 2017). Σύμφωνα με τη Χατζηπασχάλη και τους συνεργάτες (2012), υπολογίζεται ότι από ένα λίτρο τυρογάλακτος δύνανται να παραχθούν 45 λίτρα βιοαερίου, περιεκτικότητας 55% σε μεθάνιο, με το C.O.D. να μειώνεται έως και 80%. Παρά την απορρύπανση που επιτυγχάνεται και την ενέργεια που παράγεται, η εφαρμογή της αναερόβιας χώνευσης δεν είναι διαδεδομένη στις γαλακτοβιομηχανίες της χώρας μας, κυρίως λόγω έλλειψης γνώσεων και υποδομών, μεγάλων χρόνων παραμονής της αντίδρασης και απαιτήσεις για σταθερή παροχή καθημερινά σε τυρόγαλα και απόβλητα βουστασίων, χοιροτροφείων. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, στην Ελλάδα υπάρχει πρόοδος και ανάπτυξη της συγκεκριμένης

επεξεργασίας, τόσο σε μονάδες γαλακτοβιομηχανιών αλλά και μονάδες επεξεργασίας αστικών αποβλήτων και λυμάτων.

#### ▪ Σκοτεινή ζύμωση – Dark fermentation, DF

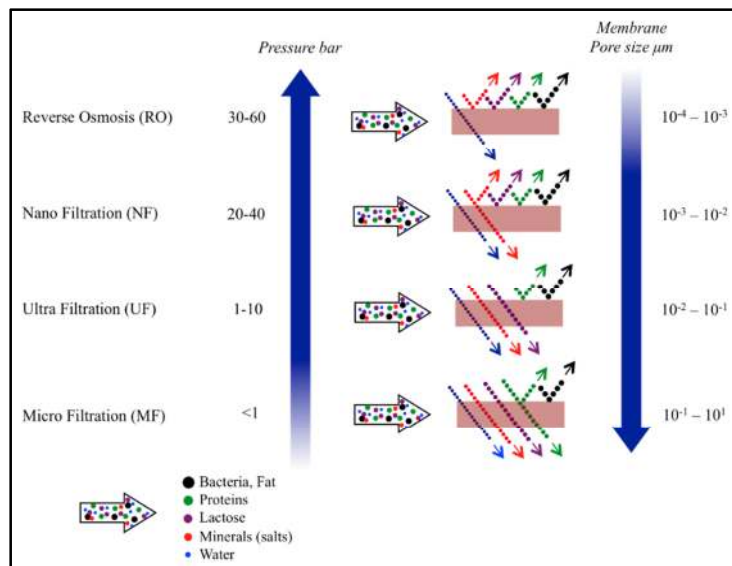
Η συγκεκριμένη βιοδιεργασία αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη επιλογή παραγωγής βιοαερίου, μετατρέποντας τη λακτόζη του τυρογάλακτος σε βιοϋδρογόνο και πτητικά λιπαρά οξέα (Volatile Fatty Acids, V.F.A.), όπως οξικό, προπιονικό, βουτυρικό (De Giannis *et al.*, 2014; Asunis *et al.*, 2019). Στο μη-επεξεργασμένο τυρόγαλα, στο οποίο δεν θα συμβεί εμβολιασμός μικροοργανισμών, αλλά θα παραμείνει με τη φυσική του μικροχλωρίδα, η σκοτεινή ζύμωση περιλαμβάνει 3 στάδια: α) την υδρόλυση της λακτόζης στα μονομερή της, γλυκόζη και γαλακτόζη, β) τη μετατροπή των μονοσακχαριτών σε γαλακτικό οξύ μέσω ομογαλακτικών βακτηρίων, όπως του γένους *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*), ένα ποσοστό ζυμώνεται και από ετερογαλακτικά βακτήρια προς παραγωγή αιθανόλης και γ) η μετατροπή του γαλακτικού και υδρογόνου και πτητικά οξέα, από μικροοργανισμούς όπως του γένους *Clostridium* (Εικόνα 26) (Asunis *et al.*, 2020). Σύμφωνα με την εργασία των De Giannis *et al.* (2014), σε τιμές pH 6,5-7,5 παρατηρήθηκε η σημαντικότερη παραγωγή βιοϋδρογόνου από τυρόγαλα, με περιεκτικότητα υδρογόνου από 53 έως 86%, με το ιδανικό pH να εξαρτάται και από τον τύπο του τυρογάλακτος, αναφορικά με το ζώο προέλευσης του γάλακτος. Στην εργασία των Asunis *et al.* (2019), η σκοτεινή ζύμωση εφαρμόστηκε σε τυρόγαλα από πρόβειο γάλα, με τη μέγιστη παραγωγή υδρογόνου να είναι 162 L ανά κιλό αναλυσκόμενου ολικού οργανικού άνθρακα (Total Organic Carbon, T.O.C.).



Εικόνα 27. Απεικόνιση των 4 σταδίων που συνυπάρχουν κατά την αναερόβια χώνευση (Asunis *et al.*, 2020).

- **Συμπυκνωμένη σκόνη ορού γάλακτος – Condensed whey powder, C.W.P.**

Η ανάγκη για μείωση του όγκου του τυρογάλακτος οδήγησε στη συμπύκνωσή του, αφαιρώντας το πλέον άφθονο συστατικό, το νερό, δίδοντας συμπυκνωμένο ορό. Η κονιοποίηση άπαχου ή κονιοποιημένου τυρογάλακτος είναι συνήθης σε πολλές χώρες. Ο βαθμός αφυδάτωσης εξαρτάται από το επιθυμητό τελικό προϊόν. Σε κάθε περίπτωση προηγείται αφυδάτωση με εξάτμιση ή χρήση μεμβρανών (Εικόνα 27) και ακολουθεί κονιοποίηση με ξήρανση ή λυοφιλίωση, για την παραγωγή σκόνης τυρογάλακτος.



Εικόνα 28. Αρχές διήθησης με μεμβράνες (Dairy processing handbook, Tetra Pak, 1995).

- **Αφαλατωμένο τυρόγαλα**

Η παρουσία των ανόργανων αλάτων στο τυρόγαλα καθιστά την αφαλάτωσή του υποχρεωτική σε πολλές των περιπτώσεων, για να μπορεί να αξιοποιηθεί βιομηχανικώς. Η χρήση μεμβρανών ή ηλεκτροδιάλυσης είναι ενδεδειγμένες μέθοδοι για την αφαίρεση των ιόντων. Η ηλεκτροδιάλυση, σε συνδυασμό με αντίστροφη ώσμωση, έως τελικής συγκέντρωσης στερεών 25%, αποδίδει το βέλτιστο αποτέλεσμα, ενώ περιορίζεται και το μέγεθος της εγκατάστασης (Ανυφαντάκης, 2004).

- **Συμπύκνωμα πρωτεϊνών ορού γάλακτος – Whey protein concentrate, WPC**

Οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος (Πίνακας 5) είναι ανθεκτικές στην πρωτεόλυση από τα πηκτικά ένζυμα, αλλά ευαίσθητες στη θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία. Ένας τρόπος απομόνωσης είναι η θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία, για να κροκκιδωθούν και να αφαιρεθούν από το πρωτογενές τυρόγαλα, προς παρασκευή τυριών

τυρογάλακτος, όπως θα αναπτυχθεί στο εδάφιο ‘1.5.3. Από το πρωτογενές στο δευτερογενές τυρόγαλα’, που ακολουθεί. Η πλέον επικρατούσα μέθοδος για την απομόνωση του κλάσματος των πρωτεϊνών και τη διοχέτευσή του στην αγορά ως προϊόν προστιθέμενης αξίας είναι η χρήση μεμβρανών και συγκεκριμένα η χρήση μεμβρανών υπερδιήθησης, με διάμετρο πόρου 0,01-0,1 μm. Οι πρωτεΐνες κατακρατούνται στη μεμβράνη, ενώ στο διήθημα διέρχονται τα υδατοδιαλυτά μόρια μικρού μοριακού βάρους, όπως η λακτόζη και τα άλατα. Η μετέπειτα μεταχείριση των πρωτεϊνών αυτών οδηγεί σε νέα προϊόντα, τα συμπυκνώματα πρωτεϊνών, διαφορετικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη. Όταν η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη είναι μεγαλύτερη του 25%, το προϊόν καλείται συμπύκνωμα πρωτεϊνών, με τα κυριότερα να είναι τα συμπυκνώματα περιεκτικότητας 35%, 55% και 80% σε πρωτεΐνη, ενώ τα προϊόντα περιεκτικότητας μεγαλύτερης του 90% καλούνται ‘Απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος – Whey protein isolates, W.P.I.’ (Πίνακας 6). Οι πρωτεΐνες μπορούν να υποστούν ενζυμική υδρόλυση προς ολιγοπεπτίδια και αμινοξέα, προϊόν που καλείται ‘Υδρόλυμα πρωτεϊνών ορού – Whey protein hydrolysate, W.P.H.’ (Kilara & Vaghela, 2018).

**Πίνακας 5.** Καταγραφή των κυριότερων πρωτεϊνών που υπάρχουν στο γλυκό τυρόγαλα, η επί τοις εκατό αναλογία κάθε μίας εξ αυτών επί του συνόλου των πρωτεϊνών, το μοριακό βάρος και το ισοηλεκτρικό τους σημείο (τροποποιημένο από Guo, 2019).

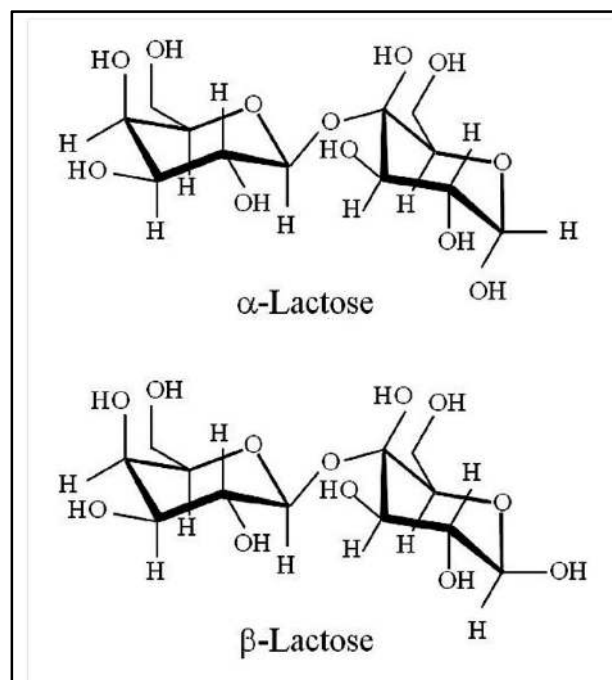
Πρωτεΐνη	Περιεκτικότητα (%) (επί των ορο-πρωτεϊνών)	Μοριακό Βάρος (g/mol)	Ισοηλεκτρικό σημείο, pI
β-Γαλακτογλοβουλίνη	50-55	18.362	5,2
α-Λακταλβουμίνη	20-25	14.147	4,5-4,8
Γλυκο-μακρο-πεπτίδιο (σε γλυκιά πήξη)	10-15	7.000	-
Αλβουμίνη του ορού	5-10	69.000	4,7-4,9
Ανοσοσφαιρίνες	10-15	150.000-1.000.000	5,5-8,3
Λακτοφερίνη	1-2	78.000	9,0

**Πίνακας 6.** Καταγραφή των συμπυκνωμένων προϊόντων πρωτεΐνης τυρογάλακτος (τροποποιημένο από Kilara & Vaghela, 2018).

Προϊόν	Πρωτεΐνη (%)	Λακτόζη (%)	Λίπος (%)	Τέφρα (%)	Υγρασία (%)
Σκόνη τυρογάλακτος	11-14,5	63-75	1-1,5	8,2-8,8	3,5-5
Σκόνη τυρογάλακτος, μειωμένης λακτόζης	18-24	52-58	1-4	11-22	3-4
Αφαλατωμένη σκόνη τυρογάλακτος	11-15	70-80	0,5-1,8	1-7	3-4
Συμπύκνωμα πρωτεϊνών ορού – 35	34-36	48-52	3-4,5	6,5-8,0	3-4,5
Συμπύκνωμα πρωτεϊνών ορού – 50	50-52	33-37	5-6	7,5-8,5	3,4-4,5
Συμπύκνωμα πρωτεϊνών ορού – 80	80-82	4-8	4-8	3-4	3,5-4,5
Απομονωμένη πρωτεΐνη ορού – 90	90-92	0,5-1,0	0,5-1,0	2-3	4,5

## ▪ Λακτόζη

Το σάκχαρο, που υπάρχει στο γάλα και το 90%, περίπου, του οποίου αποβάλλεται στο τυρόγαλα, είναι ο δισακχαρίτης D-λακτόζη. Η λακτόζη αποτελείται από τα μονομερή D-γλυκόζη και D-γαλακτόζη, συνδεδεμένα με  $\beta$ -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό (Εικόνα 28). Η μικροοργανισμοί την υδρολύουν μέσω του ενζύμου  $\beta$ -γαλακτοσιδάση, ενώ ο άνθρωπος μέσω του ανάλογου ενζύμου λακτάση (Yamauchio *et al.*, 2019). Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο εδάφιο, μετά την απομάκρυνση των πρωτεϊνών, το υγρό διάλυμα που παραμένει είναι πλούσιο σε λακτόζη. Η λακτόζη αυτή, μπορεί να αποθηκευτεί, ύστερα από κρυστάλλωση και να διοχετευτεί στην αγορά, ως ασθενές γλυκαντικό λόγω των ιδιοτήτων της για ικανότητα δέσμευσης αρωματικών ουσιών και καραμελοποίηση κατά τη θέρμανση στη βιομηχανία τροφίμων, ως υπόστρωμα μικροοργανισμών σε εργαστήρια μικροβιολογίας αλλά και στη χημική και φαρμακευτική βιομηχανία (Ανυφαντάκης, 2004).



Εικόνα 29. Απεικόνιση του δισακχαρίτη λακτόζη (Yamauchi, 2013).

Η λακτόζη, ως πηγή άνθρακα στα θρεπτικά υποστρώματα, βρίσκει εφαρμογή σε πληθώρα ζυμώσεων, βασική προϋπόθεση, όμως, είναι η ικανότητα υδρόλυσης του δισακχαρίτη από τους μικροοργανισμούς, δηλαδή η παραγωγή του ενζύμου  $\beta$ -γαλακτοσιδάση. Ενδεικτικά, η ζύμωση, υπό αναερόβιες συνθήκες, από ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια παράγει γαλακτικό οξύ, το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί περαιτέρω, προς σχηματισμό του κομποστοποιησιμου πολύ-γαλακτικού οξέος,

(P.L.A.). Η λακτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την απομόνωση και συλλογή του υδρολυτικού ενζύμου από τους μικροοργανισμούς (Larra *et al.*, 2021). Η β-D-γαλακτοσιδάση χρησιμοποιείται από τις βιομηχανίες, για τη διάσπαση της λακτόζης που υπάρχει σε διάφορα τρόφιμα, ως αντίδοτο στη δυσανεξία των καταναλωτών σε αυτή. Διάφορα αλκοολούχα ποτά και αναψυκτικά δύνανται να παραχθούν από τη λακτόζη του τυρογάλακτος, υπό ετερογαλακτική ζύμωση, με την παραγόμενη αιθανόλη να μπορεί να αξιοποιηθεί και για την παρασκευή ξυδιού.

Οι μικροβιακές καλλιέργειες σε υπόστρωμα λακτόζης χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάπτυξη βιομάζας, μονοκυτταρικής πρωτεΐνης, μονοκυτταρικού λίπους, πολυσακχαριτών, βακτηριοσινών και βιολογικών χρωστικών. Με τον όρο μονοκυτταρική πρωτεΐνη (Single Cell Protein, S.C.P.) περιγράφεται η συσσώρευση πρωτεϊνών στα κύτταρα ζυμών, μυκήτων, φυκών και βακτηρίων, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30% (Ritala *et al.*, 2017). Τα κύτταρα συλλέγονται, αποξηραίνονται και διατίθενται για τροφή ζώων ή ανθρώπων, αποτελώντας μια τροφή με προοπτική να αντιμετωπίσει τις ανάγκες του ολοένα αυξανόμενου πληθυσμού του πλανήτη (Najafpour, 2007). Οι εξωπολυσακχαρίτες (E.P.S.) είναι πολυσακχαρίτες μεγάλης αλύσεως ( $4 \cdot 10^4$ - $6 \cdot 10^6$  Da) και διακρίνονται σε όμο- και έτεροπολυσακχαρίτες. Στην πρώτη περίπτωση αποτελούνται από κατάλοιπα D-γλυκόζης ή D-φρουκτόζης, με διάφορους τύπους σύνδεσης και διακλάδωσης, ενώ οι έτεροπολυσακχαρίτες από κατάλοιπα γλυκόζης, γαλακτόζης, ξυλόζης, μαννόζης, αραβινόζης και ραμνόζης, αλλά και αμινοσάκχαρα, πολυόλες και γλυκουρονικό οξύ, περιστασιακά. Ο φυσιολογικός τους ρόλος σχετίζεται με την προστασία των μικροβιακών κυττάρων από αντιβιοτικά, φαγοκυττάρωση, τοξικές ουσίες και ωσμωτικό στρες. Ο ρόλος τους ως πρεβιοτικά υφίσταται τεράστια αναγνώριση τα τελευταία χρόνια, ενώ βρίσκουν εφαρμογή ως σταθεροποιητές και γαλακτωματοποιητές στη γαλακτοβιομηχανία και συγκεκριμένα στην παραγωγή γιαούρτης και ζυμωμένων προϊόντων γάλακτος, όπως το kefir. Τα πλέον γνωστά είδη λακτοβακίλλων που παράγουν εξωπολυσακχαρίτες είναι τα *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*. Οι βακτηριοσίνες είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια που συντίθενται από βακτήρια στο τέλος της εκθετικής φάσης και λειτουργούν ως αμυντικός μηχανισμός αναστολής της ανάπτυξης των ανταγωνιστικών πληθυσμών. Η εφαρμογή τους είναι ευρεία στη βιομηχανία τροφίμων και στους κλάδους των γαλακτοκομικών, του ψωμιού, του κρέατος, των



ιχθυηρών, των αφεψημάτων, των φρούτων και των λαχανικών, με τη νυσίνη να είναι η μόνη βακτηριοσίνη από γαλακτικά βακτήρια, που παράγεται σε βιομηχανικό επίπεδο και υπάρχει εξουσιοδότηση για εφαρμογή στα τρόφιμα ως συντηρητικός παράγοντας αναστολής ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών (Mollea *et al.*, 2012). Η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων αποτέλεσε τον κυρίαρχο στόχο της παρούσας μελέτης και θα αναπτυχθεί σε ξεχωριστό εδάφιο, που ακολουθεί.

### **1.5.3. Δευτερογενές τυρόγαλα**

Σύμφωνα με το Άρθρο 83 του Κώδικα Τροφίμων & Ποτών περί γαλακτοκομικών προϊόντων, ως «τυριά τυρογάλακτος χαρακτηρίζονται τα τυριά, τα οποία λαμβάνονται με ισχυρή αναθέρμανση τυρογάλακτος (με ή χωρίς οξίνιση) και με ή χωρίς προσθήκη: γάλακτος (πρόσγαλα), γάλακτος και κρέμας γάλακτος (αφρόγαλα) και βρώσιμου χλωριούχου νατρίου (κ. αλάτι), τα οποία μπορούν να διατεθούν νωπά (φρέσκα) [μερικά από αυτά μπορούν να διατεθούν και με μερική αφυδάτωση (ξηρά) και άλλα κατόπιν ωρίμανσης] και των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 70%». Η μυζήθρα, ο ανθότυρος και το μανούρι είναι τα κυριότερα τυριά τυρογάλακτος της χώρας μας, όπως και οι ξηρές εκδοχές τους (Ανυφαντάκης, 2004).

Η τυροκομική πρακτική παρασκευής τυριού τυρογάλακτος περιλαμβάνει θέρμανση στους 85-90 °C και παραμονή στη θερμοκρασία αυτή περί τα 15 λεπτά, ώστε να κροκκιδωθούν οι πρωτεΐνες του ορού, οι οποίες συλλέγονται και αφήνονται προς στράγγιση σε τσαντίλες ή καλούπια και σχηματισμό του τελικού προϊόντος (Εικόνα 29). Η αφαίρεση των οροπρωτεϊνών από το πρωτογενές τυρόγαλα αποδίδει ένα προϊόν με κυρίαρχο στερεό τη λακτόζη, το αποκαλούμενο δευτερογενές τυρόγαλα. Στο ίδιο αποτέλεσμα καταλήγει και η πρακτική εφαρμογή των μεμβρανών υπερδιήθησης, με διαφορετικό προϊόν να παράγεται, αλλά το παραπροϊόν να είναι το ίδιο (Ανυφαντάκης, 2004). Η σύστασή του εξαρτάται τόσο από το γάλα, απ' το οποίο προέρχεται το πρωτογενές τυρογάλα, όσο και από την προσθήκη σε γάλα, που θα γίνει κατά την παρασκευή του τυριού τυρογάλακτος. Στο δευτερογενές τυρόγαλα μπορούν να πραγματοποιηθούν όλες οι μικροβιακές ζυμώσεις, όπως αναπτύχθηκαν στο εδάφιο άνωθεν.



**Εικόνα 30.** Τυρί τυρογάλακτος – Μυζήθρα  
(Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Γ.Π.Α.)

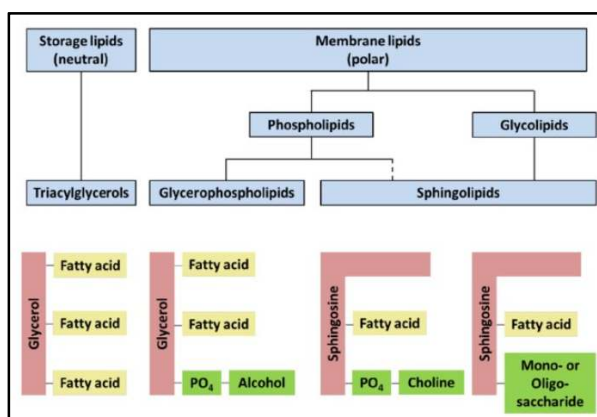
## 1.6. Μικροβιακό λίπος – Single Cell Oil, S.C.O. |

---

### 1.6.1. Λίπη & έλαια

Με τον όρο λίπος προσδιορίζεται μια μεγάλη ομάδα ουσιών όπως τα λιπαρά οξέα και τα παράγωγά τους, τα στεροειδή, τα τερπένια, τα καροτενοειδή και τα χολικά οξέα, με δομικό και ενεργειακό ρόλο, η παρουσία των οποίων στα τρόφιμα συμβάλει στη γεύση και τη διατροφική τους ποιότητα. Διατροφικά, τα λιπίδια είναι πλούσια πηγή ενέργειας, αποδίδοντας τις περισσότερες θερμίδες ανά γραμμάριο καταναλωθέντος προϊόντος, σε σύγκριση με τα λοιπά μακρομόρια των τροφών, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Τα λιπίδια έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, ενώ είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες, όπως ο διαιθυλεθέρας, το εξάνιο, το χλωροφόρμιο. Η κατηγοριοποίησή τους βασίζεται στις φυσικές τους ιδιότητες σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C και χαρακτηρίζονται ως λίπη, όταν είναι σε στερεή μορφή και ως έλαια, όταν είναι σε υγρή μορφή, στη θερμοκρασία αυτή. Η φυσική ιδιότητα αυτή εξαρτάται από το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος και από το βαθμό ακορεστότητας. Επίσης, κατηγοριοποιούνται με βάση την πολικότητά τους, το ρόλο τους (δομικά, αποθηκευτικά) και το κατά πόσο είναι απαραίτητα στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα λιπαρά οξέα σχηματίζουν εστερικούς δεσμούς, κυρίως, με τη γλυκερόλη και διακρίνονται σε πολικά (φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια) και σε άπολα ή ουδέτερα (μονο-, δι-, τρι-άκυλογλυκερόλες). Τα σφιγγολιπίδια αποτελούνται από λιπαρά οξέα εστεροποιημένα σε σφιγγοσίνη, ενώ οι κηροί είναι προϊόν εστεροποίησης του λιπαρού οξέος με λιπαρές αλκοόλες (Εικόνα 30). Η κύρια αποθηκευτική μορφή των λιπιδίων είναι τα τριγλυκερίδια, με τα φωσδολιπίδια να

επενδύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στο μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (Akoh, 2017).



Εικόνα 31. Απεικόνιση των κύριων ομάδων λιπιδίων (Hartmann, 2016)

### 1.6.2. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Η ανάγκη για εναλλακτικές πηγές τροφίμων και ενέργειας οδήγησε στην εξεύρεση λύσεων φιλικών προς στο περιβάλλον και στην ανεξάρτηση από το πετρέλαιο. Η παραγωγή μικροβιακού λίπους από μικροοργανισμούς, αξιοποιώντας ρεύματα παραπροϊόντων βιομηχανιών, παρουσίασε μεγάλο ερευνητικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Η χρήση ελαιογόνων μικροοργανισμών, δηλαδή μικροοργανισμών οι οποίοι συσσωρεύουν λιπίδια στη βιομάζα τους, με τα λιπίδια αυτά να είναι κατάλληλα για ανθρώπινη χρήση και κυρίως στην αγορά βρώσιμων ελαίων, ως εναλλακτική πηγή έναντι των φυτικών και ζωικών λιπιδίων, παρουσιάζοντα ποσοστό μεγαλύτερο του 20% (w/w) επί ξηρής μικροβιακής μάζας, γνωρίζει ολοένα και μεγαλύτερη ανάπτυξη. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το κόστος παραγωγής τους είναι μεγαλύτερο απ' το αντίστοιχο των λιπών και ελαίων συμβατικής ζωικής και φυτικής παραγωγής (σπορέλαιο, ηλιέλαιο, κραμβέλαιο) (Papanikolaou & Aggelis, 2011a; Ratledge, 2013; Cortes & de Carvalho, 2015). Σε περίπτωση καλλιέργειας στη γλυκόζη ή σε κάποιο άλλο αντίστοιχο υλικό (π.χ. λακτόζη, γλυκερόλη) οι μικροοργανισμοί αυτοί, όταν βρεθούν σε περιβάλλον με περίσσεια άνθρακα και πενία κάποιου άλλου θρεπτικού συστατικού, συνήθως έλλειψη αζώτου, καταβολίζουν την πηγή άνθρακα, συνθέτουν λιπίδια και τα αποθηκεύουν. Εν αντιθέσει με αυτούς, οι μη-ελαιογόνοι μικροοργανισμοί καταναλώνουν την πηγή άνθρακα και σχηματίζουν πολυσακχαρίτες (γλυκογόνο, γλυκάνες, μαννάνες, κ.ο.κ.) (Zuccaro *et al.*, 2020). Όλοι οι μικροοργανισμοί είναι

ικανοί να συνθέσουν λιπίδια, μόνο όμως οι ελαιογόνοι δύνανται να συσσωρεύσουν σημαντικές ποσότητες στα κύτταρά τους (Paranikolaou & Aggelis, 2011a).

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί ανήκουν στα βασίλεια των μυκήτων, των ζυμών, των βακτηρίων και των μικροφυκών (Πίνακας 7) (Ma, 2006; Arous *et al.*, 2019). Οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, ως επί το πλείστον, αποθησαυρίζουν λιπίδια, υπό μορφή τριακυλογλυκερολών (T.A.G.), όμοια με τα φυτικά έλαια, ενώ οι προκαρυωτικοί πιο ιδιαίτερα λιπίδια. Η χαμηλή λιποσυσσώρευση των βακτηρίων οδήγησε τους ερευνητές στην καλλιέργεια μικροφυκών και ζυμών. Τα μικροφύκη, που ανήκουν στους φωτοαυτότροφους μικροοργανισμούς, αξιοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα, ως πηγή άνθρακα και το φως ως πηγή ενέργειας, ενώ τα ετερότροφα στελέχη χρησιμοποιούν οργανικές ουσίες, ως πηγή άνθρακα. Στα μιξοτροφικά συστήματα, γίνεται συν-καλλιέργεια φωτοαυτότροφων και ετερότροφων μικροφυκών. Τα μικροφύκη αναπτύσσονται ταχέως, με χρόνο διπλασιασμού της βιομάζας κάθε 24 ώρες και υψηλή συγκέντρωση λιπιδίων, ειδικά σε στελέχη των οικογενειών Chlorophyta και Bacillariophyceae. Η καλλιέργεια των μικροφυκών μειονεκτεί λόγω απαιτήσεων σε μεγάλες εγκαταστάσεις και μεγαλύτερο χρόνο διπλασιασμού από τα βακτήρια, που ανήκουν στα γένη των ακτινομυκήτων, όπως τα *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* και *Streptomyces*. Ζύμες των γενών *Yarrowia*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula* και *Lipomyces*, όπως και μυκηλιακοί μύκητες του γένους *Mortierella* έχουν μελετηθεί διεξοδικά για την παραγωγή μικροβιακού λίπους (Arous *et al.*, 2019). Τα λιπίδια που συσσωρεύουν οι ελαιογόνοι πολυκύτταροι μύκητες είναι πιο ακόρεστα από τα αντίστοιχα των ζυμών, γι' αυτό χρησιμοποιούνται κυρίως αυτοί οι μικροοργανισμοί για την παραγωγή λιπών και ελαίων διατροφικού και ιατρικού ενδιαφέροντος, όπως το γ-λινολενικό οξύ ( $\Delta^{6,9,12}$ C18:3 G.L.A.) και το αραχιδονικό οξύ ( $\Delta^{5,8,11,14}$ C20:4). Η αδυναμία των ζυμών να παράξουν λιπίδια υψηλού ενδιαφέροντος, έχει οδηγήσει τους ερευνητές στη χρήση της γενετικής μηχανικής, για τροποποίηση των μικροβιακών στελεχών (Paranikolaou & Aggelis, 2011a).

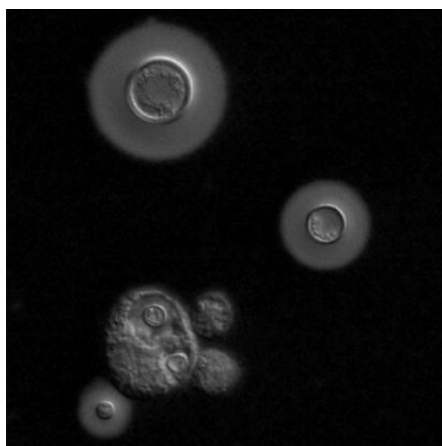
**Πίνακας 7.** Μικροοργανισμοί και η ποσοστιαία περιεκτικότητα σε λιπίδια επί ξηρής βιομάζας (Arous *et al.*, 2019).

Microorganisms	Oil content (% dry wt)	Microorganisms	Oil content (% dry wt)
<b>Microalgae</b>		<b>Yeasts</b>	
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
<b>Bacteria</b>		<b>Fungi</b>	
<i>Arthrobacter</i> sp.	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27–38	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24–25	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18–24	<i>Mortierella vinacea</i>	66

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται ευρέως στην αξιοποίηση παραπροϊόντων προς παραγωγή μεταβολιτών, λόγω των υψηλότερων ρυθμών ανάπτυξης, σε σχέση με τους νηματοειδείς μύκητες, της ικανότητάς τους να καταβολίζουν πληθώρα υποστρωμάτων και πηγών άνθρακα και την μορφολογική τους καταλληλότητα για παραγωγή μονοκυτταρικού λίπους σε μεγάλη κλίμακα (Papanikolaou & Aggelis, 2011a, 2011b; Arous *et al.*, 2015, 2019).

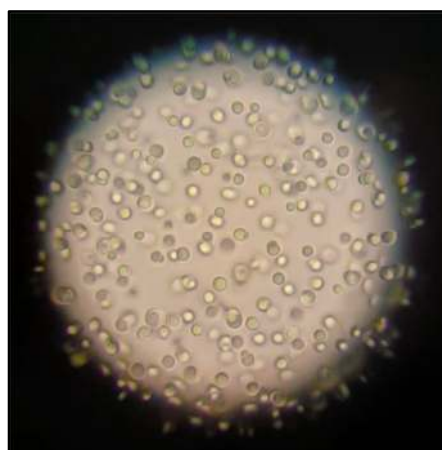
Οι ζύμες του γένους *Cryptococcus* ανήκουν στους βασιδιομύκητες, χαρακτηρίζονται από σφαιρικά έως και επιμήκη κύτταρα, αναπαράγονται αγενώς και τα περισσότερα είδη περιβάλλονται από κάψουλα, μια παχιά στοιβάδα πολυσακχαριτών, κυρίως γλυκουρονοξυλομαννάνη (G.X.M.) και γαλακτοξυλομαννάνη (Gal.X.M.) και γλυκοπρωτεϊνών (Zaragoza *et al.*, 2009) (Εικόνα 31). Οι αποικίες, που σχηματίζουν σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα είναι μεγάλες στρογγυλές και κρεμώδεις, κυρίως λευκού χρώματος, ενώ τα καρτενοειδή δίνουν ιδιαίτερα χρώματα στις αποικίες κάποιων στελεχών. Όλα τα είδη του γένους παράγουν το ένζυμο ουρεάση, δεν είναι ζυμωτικά, κάποια έχουν τη δυνατότητα αφομοίωσης των νιτρικών αλάτων και όλα αφομοιώνουν την ινοσιτόλη, το οποίο χαρακτηριστικό κάνει τα είδη του γένους να διαφοροποιούνται από τα αντίστοιχα στελέχη του γένους *Rhodotorula* (McDonald *et al.*, 2012). Διάφορα στελέχη του γένους *Cryptococcus* χρησιμοποιούνται για την αξιοποίηση ρευμάτων παραπροϊόντων βιομηχανιών, όπως ο *C. curvatus*, *C. laurentii* και ο *C. podzolicus* (Arous *et al.*, 2019). Το pH της καλλιέργεια των μικροοργανισμών του γένους κυμαίνεται από 5,3 έως 5,9 με μέση τιμή περί το 5,6 (Harrison *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2014; Carota *et al.*, 2017).

Ο μικροοργανισμός *Cryptococcus curvatus* (γνωστός και ως *Candida curvata*) παρουσιάζει υψηλό βιομηχανικό ενδιαφέρον, με το στελέχος *C. curvatus* ATCC 20509 να έχει μελετηθεί εκτενώς για την συσσώρευση μονοκυτταρικού λίπους (Εικόνα 32) για παραγωγή βιοντίζελ και λίπους ανάλογου αυτού του κακάο (cocoa butter). Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε υποστρώματα πολλών διαφορετικών πηγών άνθρακα, ενδεικτικά των οποίων είναι η γλυκόζη, η σουκρόζη, η λακτόζη, η τρεχαλόζη, η κυτταρίνη και η γλυκερόλη (Fonseca *et al.*, 2011). Ο *C. curvatus* αναπτύσσεται στο πρωτογενές και δευτερογενές τυρόγαλα, αυτούσιο ή αναμεμιγμένο με άλλα παραπροϊόντα, με στόχο την παραγωγή βιομάζας και μικροβιακού λίπους (Moon *et al.*, 1978; Floetenmeyer *et al.*, 1985; Takakuwa & Saito, 2010; Seo *et al.*, 2014; Kopsahelis *et al.*, 2017; Carota *et al.*,



**Εικόνα 32.** Απεικόνιση κυττάρων από στελέχη του γένους *Cryptococcus*, βαμμένα με τη χρωστική India ink, για να γίνει διακριτή η ζώνη της κάψουλας γύρω από το κύτταρο. Τα 2 μικρά κύτταρα κάτω-αριστερά στην εικόνα έχουν φαγοκυτταρωθεί, ενώ τα μεγάλα (titan cells), διαθέτουν παχιά κάψουλα και δεν φαγοκυτταρώνονται εύκολα από τα κύτταρα του ξενιστή (McDonald *et al.*, 2012).

2017).

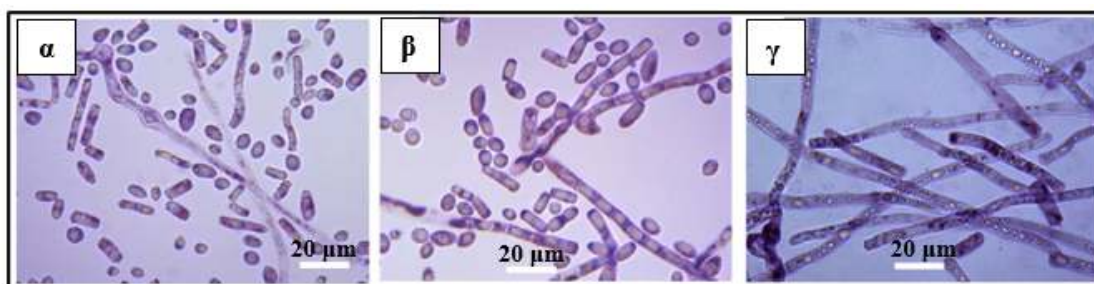


**Εικόνα 33.** Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x40), με ευκρινές το αποθηκευμένο λίπος σε ελαιοσταγονίδια εντός του κυττάρου (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας,

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Cryptococcus laurentii* (συνώνυμος του *Cryptococcus magnus*, γνωστός πλέον ως *Papiliotrema laurentii*) σε τυρόγαλα, προς παραγωγή βιομάζας και μικροβιακού λίπους μελετήθηκε από τους Castanha και



συνεργάτες (2013, 2014), σε συν-καλλιέργεια με μελάσα. Ο μικροοργανισμός *Cutaneotrichosporon cutaneum* (γνωστό και ως *Trichosporon cutaneum*) ήταν από τους πρώτους που μελετήθηκε για την παραγωγή λιπιδίων από τυρόγαλα (Atkin *et al.*, 1967, Moon *et al.*, 1978). Μελέτη του Wang και των συνεργατών του (2019) παρουσίασε το διμορφισμό, που εμφανίζει αυτό το είδος. Η αφομοίωση του αζώτου αξιολογήθηκε ως μια από τις σημαντικότερες αιτίες για την εμφάνιση του μικροοργανισμού ως κύτταρα ζύμης ή ως υφές. Η αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος ζύμης στο υγρό της καλλιέργειας, οδηγούσε σε αύξηση των υφών (Εικόνα 33). Η ζύμη *Debaryomyces hansenii* (γνωστή και ως *Candida famata*) ανήκει στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς και αποτελεί ενδιαφέρουσα περίπτωση, λόγω της ανοχής σε οσμωτικά φαινόμενα, της μεγάλης αλοανθεκτικότητας (ακόμη και συγκεντρώσεις άλατος 20-24% w/v) της ανάπτυξης σε ευρεία περιβάλλοντα και της ικανότητας πρωτεόλυσης και λιπόλυσης. Οι 2 προηγούμενες βιοδιεργασίες βρίσκουν εφαρμογή στην ωρίμανση των τυριών (Takaç & Şengel, 2009). Το εύρος του pH, στο οποίο επιβιώνει, είναι 2,5-9, με το ιδανικό να βρίσκεται στις τιμές περί του 5-6 (Praphailong & Fleet, 1991; Fleet, 2011). Η παραγωγή ενζύμων όπως α-γαλακτοσιδάση, β-γλυκοσιδάση και προϊόντων όπως D-αραβιτόλης, ριβοφλαβίνης, πυροσταφυλικού οξέος και σορβικού καλίου έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Breuer & Harms, 2006; Viana *et al.*, 2011). Για τον μικροοργανισμό αυτόν, όπως και για τους *Naganishia uzbekistanensis* (ή *Cryptococcus uzbekistanensis*) και *Trichosporon onoides* δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά περί ανάπτυξής τους στο τυρόγαλα προς παραγωγή μικροβιακού λίπους.



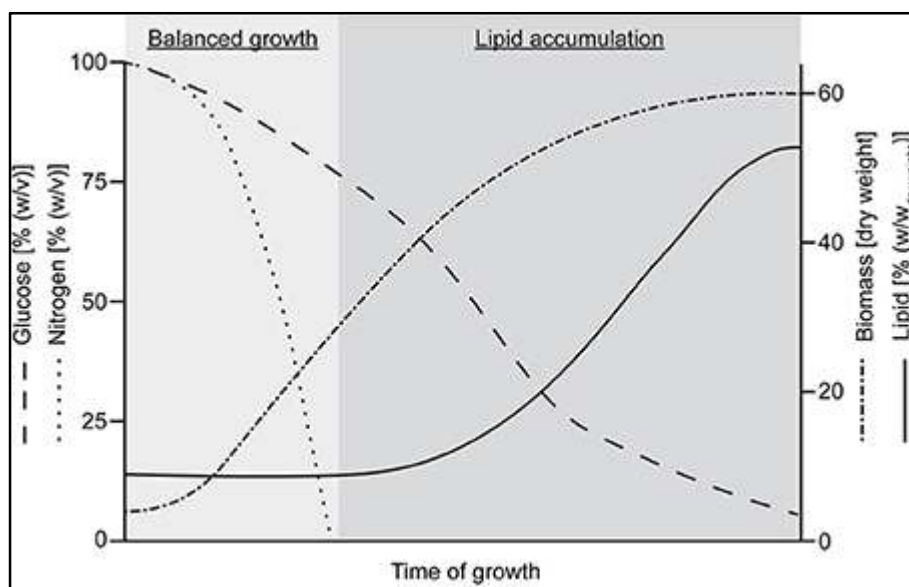
**Εικόνα 34.** Μικροσκοπική παρατήρηση του *T. cutaneum* (μεγέθυνση x1000), ύστερα από ανάπτυξη σε γλυκόζη 60g/L και συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης α) 1g/L, β) 3g/L και γ) 5g/L (τροποποιημένο από Wang *et al.*, 2019).

### 1.6.3. Η βιοχημεία της συσσώρευσης λίπους

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών γίνεται σε πληθώρα υποστρωμάτων, με τις πηγές άνθρακα να προέρχονται κυρίως από παραπροϊόντα βιομηχανιών τροφίμων, τα οποία είναι πλούσια σε θρεπτικά μικροστοιχεία (Papanikolaou & Aggelis, 2011a; Arous *et al.*, 2019). Όταν η πηγή άνθρακα είναι τα σάκχαρα υδατανθράκων ή αναλόγως καταβολιζόμενες ενώσεις, όπως η γλυκερόλη, η συσσώρευση λιπιδίων αποκαλείται “*de novo*”. Στον αντίποδα, όταν η καλλιέργεια επισυμβαίνει σε υδρόφοβα υποστρώματα λιπών και ελαίων (λ.χ. μαγειρεμένο λάδι – *used cooked oil*), οι μικροοργανισμοί αφομοιώνουν τα υδρολυμένα λιπαρά οξέα και με αυτά συνθέτουν νέες ακυλογλυκερόλες, διαδικασία, που αποκαλείται “*ex novo*” βιοσύνθεση λιπών (Papanikolaou & Aggelis, 2011a). Παράμετροι όπως ο λόγος C/N, ο ρυθμός αερισμού, η θερμοκρασία, ο χρόνος επώασης, το pH και η συγκέντρωση των αλάτων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση του λίπους (Madani *et al.*, 2017; Mhlongo *et al.*, 2021).

Η “*de novo*” βιοσύνθεση λιπιδίων βασίζεται στον καταβολισμό του σακχάρου και την κατεύθυνση της αναβολικής διαδικασίας προς τη βιοσύνθεση λιπιδίων, μέσω αντιστροφής των αντιδράσεων της β-οξειδωσης, του βιοχημικού μονοπατιού καταβολισμού των λιπαρών οξέων. Τα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται, εστεροποιούνται με ένα μόριο γλυκερόλης, σχηματίζοντας τα δομικά και αποθησαυριστικά λιπίδια. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο θρεπτικό μέσο, σε μια καλλιέργεια που έχει ως στόχο τη λιποσυσσώρευση, βασίζεται σε 2 μηχανισμούς: Αρχικά στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων και έπειτα στη συσσώρευση λίπους εντός των ήδη σχηματισθέντων κυττάρων (Papanikolaou & Aggelis, 2011b) (Εικόνα 34). Λόγω αυτών, το λίπος υπάγεται στους δευτερογενείς μεταβολίτες, δηλαδή μικρά οργανικά μόρια, που παράγονται από έναν οργανισμό, αλλά δεν είναι πρωταρχικής σημασίας για την ανάπτυξη και αναπαραγωγή του (Monfil & Casas-Flores, 2014). Για να στραφεί ο μεταβολισμός προς το αναβολικό αυτό μονοπάτι, προϋποθέτει τον περιορισμό σε κάποιο θρεπτικό στοιχείο της ζύμωσης, με την έλλειψη αζώτου να είναι ο κύριος περιοριστικός παράγοντας για τη βιοσύνθεση νέων κυττάρων, αλλά συνάμα το εφελτήριο για την βιοσύνθεση λιπιδίων (Papanikolaou & Aggelis, 2011a). Ο περιορισμός σε θείο επηρεάζει τη βιοσύνθεση μερικών αμινοξέων και κυτταρικών συμπαραγόντων, χωρίς τα οποία δεν υπάρχει κυτταρικός πολλαπλασιασμός, άρα

ευνοείται η λιποσυσσώρευση. Η έλλειψη και σε άλλα μεταλλικά στοιχεία, όπως μαγνήσιο, φώσφορο, κάλιο και ασβέστιο μπορεί, επίσης να ευνοήσει το αναβολικό αυτό μοτίβο. Τόσο η λιποπεριεκτικότητα όσο και η σύσταση σε λιπαρά οξέα επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως ο αερισμός, η θερμοκρασία, το pH, η διάρκεια επώασης, το μέγεθος του εμβολίου, τα ανόργανα άλατα και, φυσικά, από τον ίδιο τον μικροοργανισμό (Arous *et al.*, 2019).

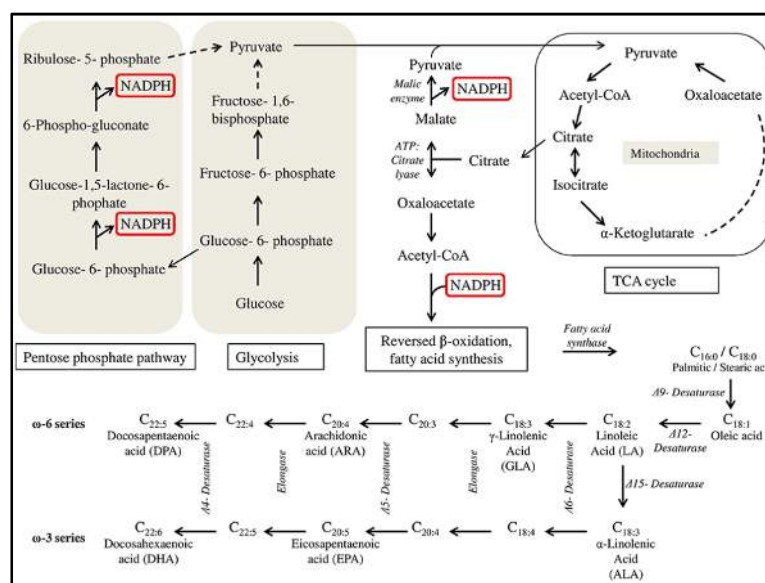


**Εικόνα 35.** Τυπική πορεία κινητικής για τη συσσώρευση λιπιδίων από ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Wynn & Ratledge, 2005; Ochsenreither *et al.*, 2016).

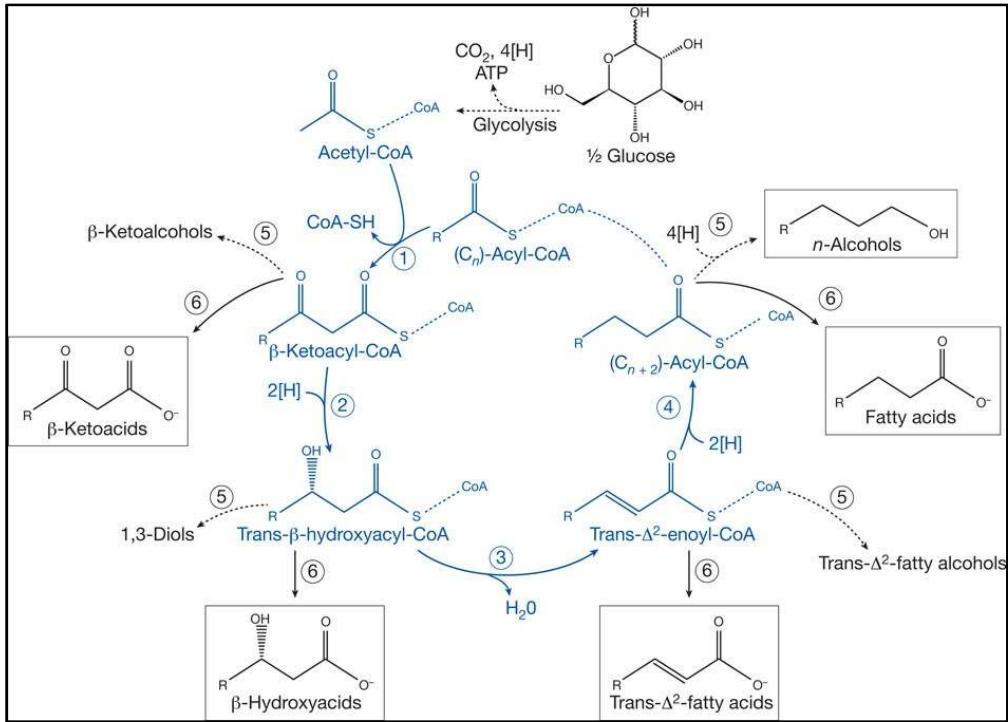
Η βιοχημεία της *de novo* βιοσύνθεσης λιπιδίων διαχωρίζεται σε 2 σκέλη: α) στον καταβολισμό της πηγής άνθρακα και την παραγωγή ακετυλο-συνενζύμου Α και β) τη βιοσύνθεση των τριγλυκεριδίων. Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα παραγωγής υψηλής ποσότητας ακετυλο-CoA, το οποίο λόγω πενίας αζώτου, οδεύει προς τις αντιδράσεις αντιστροφής της β-οξειδωσης. Η γλυκόλυση του σακχάρου οδηγεί στην παραγωγή πυροσταφυλικού οξέος, το οποίο, υπό αερόβιες συνθήκες και την παρουσία του ενζύμου αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού, μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA και εισέρχεται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων, προς καταβολισμό σε CO<sub>2</sub>, με ταυτόχρονη παραγωγή μορίων μεταφοράς ηλεκτρονίων (NADH, FADH<sub>2</sub>) προς τα συνένζυμα που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και ένα μόριο GTP (ανάλογο του ενεργειακού νομίσματος ATP). Η βιοσύνθεση των λιπιδίων εκκινεί από τη συσσώρευση κιτρικού οξέος. Το κιτρικό οξύ συσσωρεύεται λόγω αναστολής λειτουργίας του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση, που μετατρέπει το ισοκιτρικό σε α-κετογλουταρικό οξύ. Ο λόγος για τον οποίο

αδρανοποιείται το ένζυμο είναι η έλλειψη της μονοφωσφορικής αδενοσίνης, AMP, η οποία διασπάται από το ένζυμο AMP-απαμινάση προς απελευθέρωση ιόντων αμμωνίου  $\text{NH}_4^+$ , για να καλυφθούν οι ανάγκες των μικροοργανισμών (Papanikolaou & Aggelis, 2011a) (Εικόνα 35).

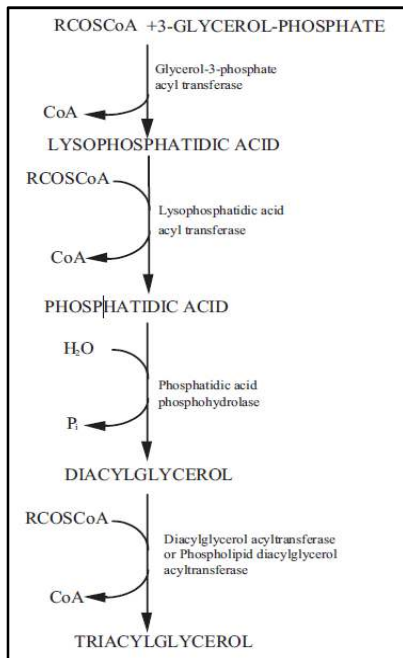
Η βιοσυσσώρευση λιπιδίων χωρεί εν τη απουσία αζώτου, γιατί ο κύκλος του Krebs αναστέλλεται κυρίως λόγω της έλλειψης αυτού και κατ' επέκταση ενός καταρράκτη αντιδράσεων που πραγματοποιούνται. Η συσσώρευση του ισοκιτρικού και, άρα του κιτρικού, λόγω ισομερείωσης από την ισοκιτρική ακονιτάση εντός του μιτοχονδρίου, έχει ως απόρροια τη μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα και τη διάσπασή του, από το ένζυμο ATP-κιτρική λυάση, προς ακετύλο-CoA και οξαλοξικό οξύ. Το ακετύλο-CoA αντιδράει με  $\text{CO}_2$ , μέσω του ενζύμου καρβοξυλάση του ακετύλο-CoA, σχηματίζοντας το μαλόνυλο-CoA, η ενεργοποιημένη μορφή του οποίου είναι το μαλόνυλο-ACP (ACP: πρωτεΐνη μεταφοράς ακυλομάδων). Το μαλόνυλο-ACP είναι το μόριο-εξέδρα, το οποίο επεκτείνεται με την προσθήκη νέων μορίων ακετύλο-ACP, μέσω των 4 σταδίων αντιστροφής της β-οξειδωσης, με βασικό συμπαράγοντα το NADPH (Εικόνα 36). Μετά από κάθε κύκλο των αναβολικών αντιδράσεων, ο ακυλο-CoA εστέρας επεκτείνεται κατά 2 άτομα άνθρακα, έως τον ακύλο-CoA εστέρα 16 ατόμων άνθρακα (16:0). Η προσθήκη επιπλέον ατόμων άνθρακα ή/και διπλών δεσμών στην αλειφατική αλυσίδα συμβαίνει με τη βοήθεια ενζύμων (Πίνακες 8 & 9) (Papanikolaou & Aggelis, 2011a).



**Εικόνα 36.** Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων υπό συνθήκες παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε ελαιογόνους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (Ochsenreither *et al.*, 2016)



**Εικόνα 37.** Αντιδράσεις αντιστροφής της β-οξειδωσης. Τα ένζυμα που εμπλέκονται είναι τα κάτωθι: (1): θειολάση, (2): υδροξυ-ακυλο-CoA αφυδρογονάση, (3): ενούλο-CoA ενυδατάση, (4): ενούλο-CoA αναγωγάση, (5): αλκοολική αφυδρογονάση, (6): ακυλο-CoA θειεστεράση (Dellomonaco, 2011).



**Εικόνα 38.** Αντιδράσεις σχηματισμού ακυλογκερολών μέσω του μονοπατιού ακυλίωσης της φωσφορικής α-γλυκερόλης (Paranikolaou & Aggelis, 2011a).



**Πίνακας 8.** Συστηματική, κοινή και συνοπτική ονομασία των κορεσμένων λιπαρών οξέων (Ακοη, 2017).

Systematic Name	Common Name	Shorthand
Methanoic	Formic	1:0
Ethanoic	Acetic	2:0
Propanoic	Propionic	3:0
Butanoic	Butyric	4:0
Pentanoic	Valeric	5:0
Hexanoic	Caproic	6:0
Heptanoic	Enanthic	7:0
Octanoic	Caprylic	8:0
Nonanoic	Pelargonic	9:0
Decanoic	Capric	10:0
Undecanoic	—	11:0
Dodecanoic	Lauric	12:0
Tridecanoic	—	13:0
Tetradecanoic	Myristic	14:0
Pentadecanoic	—	15:0
Hexadecanoic	Palmitic	16:0
Heptadecanoic	Margaric	17:0
Octadecanoic	Stearic	18:0
Nonadecanoic	—	19:0
Eicosanoic	Arachidic	20:0
Docosanoic	Behenic	22:0
Tetracosanoic	Lignoceric	24:0
Hexacosanoic	Cerotic	26:0
Octacosanoic	Montanic	28:0
Tricontanoic	Melissic	30:0
Dotriacontanoic	Lacceroic	32:0

**Πίνακας 9 .** Συστηματική, κοινή και συνοπτική ονομασία των ακόρεστων λιπαρών οξέων (Ακοη, 2017).

Systematic Name	Common Name	Shorthand
<i>c</i> -9-Dodecenoic	Lauroleic	12:1 $\omega$ 3
<i>c</i> -5-Tetradecenoic	Physeteric	14:1 $\omega$ 9
<i>c</i> -9-Tetradecenoic	Myristoleic	14:1 $\omega$ 5
<i>c</i> -9-Hexadecenoic	Palmitoleic	16:1 $\omega$ 7
<i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13-Hexadecatrienoic	—	16:3 $\omega$ 3
<i>c</i> -4, <i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13-Hexadecatetraenoic	—	16:4 $\omega$ 3
<i>c</i> -9-Octadecenoic	Oleic	18:1 $\omega$ 9
<i>c</i> -11-Octadecenoic	<i>cis</i> -Vaccenic (Asclepic)	18:1 $\omega$ 7
<i>t</i> -11-Octadecenoic	Vaccenic	<sup>a</sup>
<i>t</i> -9-Octadecenoic	Elaidic	<sup>a</sup>
<i>c</i> -9, <i>c</i> -12-Octadecadienoic	Linoleic	18:2 $\omega$ 6
<i>c</i> -9- <i>t</i> -11-Octadecadienoic acid	Rumenic <sup>b</sup>	<sup>a</sup>
<i>c</i> -9, <i>c</i> -12, <i>c</i> -15-Octadecatrienoic	Linolenic	18:3 $\omega$ 3
<i>c</i> -6, <i>c</i> -9, <i>c</i> -12-Octadecatrienoic	$\gamma$ -Linolenic	18:3 $\omega$ 6
<i>c</i> -6, <i>c</i> -9, <i>c</i> -12, <i>c</i> -15-Octadecatetraenoic	Stearidonic	18:4 $\omega$ 3
<i>c</i> -11-Eicosenoic	Gondoic	20:1 $\omega$ 9
<i>c</i> -9-Eicosenoic	Gadoleic	20:1 $\omega$ 11
<i>c</i> -8, <i>c</i> -11, <i>c</i> -14-Eicosatrienoic	Dihomo- $\gamma$ -linolenic	20:3 $\omega$ 6
<i>c</i> -5, <i>c</i> -8, <i>c</i> -11-Eicosatrienoic	Mead's	20:3 $\omega$ 9
<i>c</i> -5, <i>c</i> -8, <i>c</i> -11, <i>c</i> -14-Eicosatetraenoic	Arachidonic	20:4 $\omega$ 6
<i>c</i> -5, <i>c</i> -8, <i>c</i> -11, <i>c</i> -14, <i>c</i> -17-Eicosapentaenoic	Eicosapentaenoic	20:5 $\omega$ 3
<i>c</i> -13-Docosenoic	Erucic	22:1 $\omega$ 9
<i>c</i> -11-Docosenoic	Cetoleic	22:1 $\omega$ 11
<i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13, <i>c</i> -16, <i>c</i> -19-Docosapentaenoic	DPA, Clupanodonic	22:5 $\omega$ 3
<i>c</i> -4, <i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13, <i>c</i> -16, <i>c</i> -19-Docosahexaenoic	DHA, Cervonic	22:6 $\omega$ 3
<i>c</i> -15-Tetracosenoic	Nervonic (Selacholeic)	24:1 $\omega$ 9

<sup>a</sup> Shorthand nomenclature cannot be used to name *trans* fatty acids.  
<sup>b</sup> One of the conjugated linoleic acid (CLA) isomers.

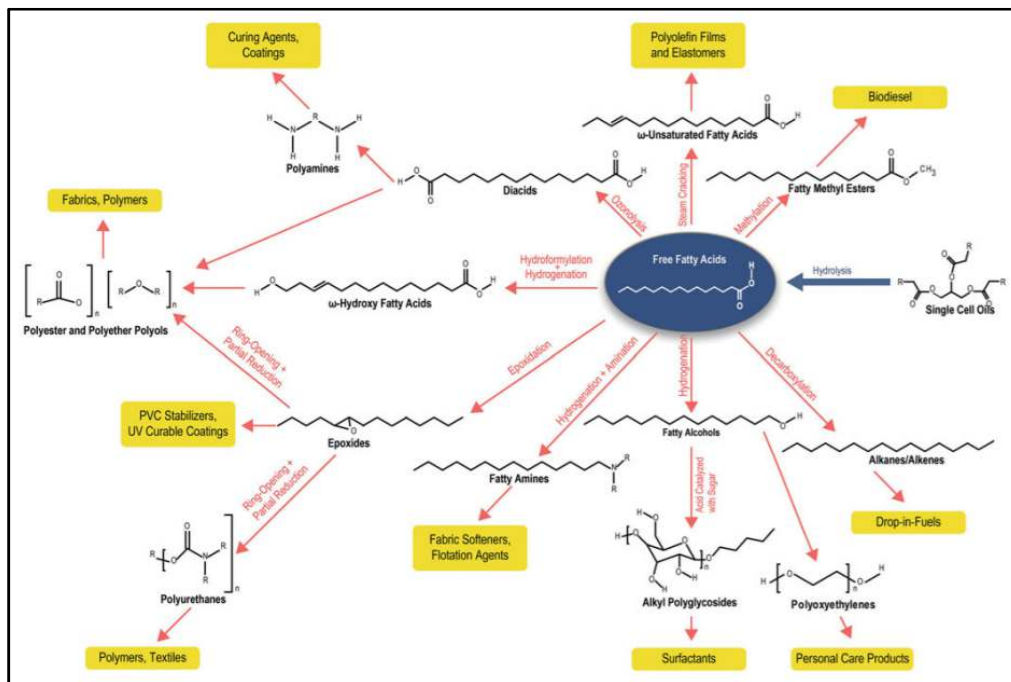


Τα παραγόμενα λιπίδια γνωρίζουν ευρεία εφαρμογή στους τομείς των βιοκαυσίμων, της χημικής και φαρμακευτικής βιομηχανίας, της κοσμητολογίας, της ανθρώπινης διατροφής και των ζωοτροφών (Εικόνα 38). Το βιοντίζελ είναι προϊόν μετεστεροποίησης των τριακυλογλυκερολών, με λιγότερους ρύπους απ' ό τι το ορυκτό πετρέλαιο και κύρια πηγή τα φυτικά έλαια, φοινικέλαιο, το έλαιο από ελαιοκράμβη, από σόγια και από ηλιοτρόπιο. Όμως, η αξιοποίηση αρόσιμης γης και βρώσιμων πηγών ελαίων για παραγωγή καυσίμων, κι όχι για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών της ανθρωπότητας, πυροδότησε θέματα βιοηθικής. Η αξιοποίηση παραπροϊόντων για την παραγωγή λιπιδίων που άπτονται στον τομέα των βιοκαυσίμων θεωρείται η ιδανική εναλλακτική (Ochsenreither *et al.*, 2016; Madani *et al.*, 2017; Cho & Park, 2018;).

Τα πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα (Poly-Unsaturated Fatty Acid - P.U.F.A.) εμπλέκονται σε πολλές διαφορετικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού και ως εκ τούτου είναι απαραίτητα και σημαντικά για την ανθρώπινη υγεία. Τα πολύ-ακόρεστα της κατηγορίας ω-3 και ω-6 συμμετέχουν ως δομικά στοιχεία των φωσφολιπιδίων και ως πρόδρομα των εικοσανοειδών, ουσίες που επηρεάζουν ευεργετικά το καρδιαγγειακό, ανοσοποιητικό και νευρικό σύστημα. Το αραχιδονικό οξύ (ARA, 20:4, ω-6) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA, 22:6, ω-3) συμμετέχουν στο φλοιό του εγκεφάλου και στον αμφιβληστροειδή. Ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει λιπαρά οξέα όπως λινελαϊκό και α-λινολενικό οξύ, οπότε η πρόσληψη μέσω της τροφής καθίσταται μονόδρομος. Στη βιομηχανία τροφίμων, τα πλούσια σε P.U.F.A. (DHA και ARA) λιπίδια χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων για ενίσχυση και συμπλήρωση της σύνθεσης συγκεκριμένων τροφίμων, όπως η βρεφική τροφή. Το πρώτο εμπορικώς διαθέσιμο μικροβιακό λίπος παράχθηκε το 1985 και ήταν πλούσιο σε γ-λινολενικό οξύ (G.L.A., 18:3, ω-6) (Ochsenreither *et al.*, 2016). Έλαιο πλούσιο σε γ-λινολενικό οξύ θεωρείτο ότι συνεισφέρει στη θεραπεία ασθενειών, ανακουφίζει από τον πόνο της έμμηνου ρύσης και δρα ως αντιφλεγμονώδες (Ratledge, 2013; Rezapour-Firouzi, 2017). Τη δεκαετία του 1980 εξερευνήθηκε η παρασκευή υποκατάστατων βουτύρου του κακάο, οπότε ο μικροοργανισμός *C. curvatus* τροποποιήθηκε γενετικώς για αποκλεισμό του ενζύμου δεσατουράση 1-9, το οποίο μετατρέπει το κορεσμένο στεατικό στο ακόρεστο ελαϊκό οξύ (18:1, ω-9), προς συσσώρευση του στεατικού και επίτευξη της αναλογίας

παλμιτικού-στεατικού-ελαϊκού 28:35:35 (% w/w), που αντιστοιχεί στο βούτυρο του κακάο (Ochsenreither *et al.*, 2016).

Οι ελαιοχημικές ουσίες, δηλαδή λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες και μεθυλεστέρες, ορίζονται συνήθως ως χημικές ενώσεις που προέρχονται από τριακυλογλυκερόλες φυτικής ή ζωικής προελεύσεως, ενώ, πλέον, προέρχονται και από μικροβιακό λίπος. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία παραγωγής σαπουνιών, απορρυπαντικών, αλλά και ως πρόσθετα καλλυντικών και γεύσης (Probst *et al.*, 2015; Ochsenreither *et al.*, 2016).



**Εικόνα 39.** Απεικόνιση των μονοπατιών μετατροπής του μικροβιακού λίπους και των λιπαρών οξέων σε χημικές ουσίες βιομηχανικού ενδιαφέροντος και τα τελικά παραγόμενα προϊόντα (Probst *et al.*, 2015).

## 2. Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης βασίστηκε σε 2 άξονες:

1) Η άκρατη ρύπανση, που βιώνει ο πλανήτης, πρέπει να ελαττωθεί. Η εξεύρεση καίριων λύσεων αντιμετώπισης του κοινωνικού αυτού προβλήματος είναι πιο αναγκαία από ποτέ, με την επιστημονική κοινότητα να στρέφει το ενδιαφέρον της προς την κατεύθυνση, πρωτίστως, την μείωσης των αποβλήτων και, έπειτα, στην αξιοποίηση των υπολοίπων. Η γαλακτοβιομηχανία και η τυροκομία είναι από τις λίγες βιομηχανίες που έχουν επιβιώσει στην Ελλάδα, αποτελώντας βασικούς πυλώνες της οικονομίας της χώρας, όμως η παραγωγική διαδικασία καταλήγει σε ένα απόβλητο υψηλού ρυπαντικού φορτίου.

2) Η εκμετάλλευση των αποβλήτων μπορεί να συμβεί μέσω της κυκλικής οικονομίας και της πράσινης ανάπτυξης. Στα πλαίσια αυτών, ένα παραπροϊόν ευτελούς κόστους θα οδηγήσει στην παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Το περιβάλλον επωφελείται λόγω μείωσης των ρυπαντών και η οικονομία λόγω των νέων προϊόντων που υπεισέρχονται σε αυτήν, άρα το όφελος είναι πολλαπλό.

Ο σκοπός, λοιπόν, είναι η βιοτεχνολογική αξιοποίηση του δευτερογενούς τυρογάλακτος, προς παραγωγή κυτταρικής βιομάζας και μεταβολιτών, με τη χρήση κυττάρων ζυμών. Μεταβολίτες, όπως το μικροβιακό λίπος, δύνανται να αξιοποιηθούν από τη βιομηχανία ελαιοχημικών και «2<sup>ης</sup> γενιάς» βιοντίζελ.

## **3. Υλικά & Μέθοδοι**

### 3.1. Βιολογικό υλικό |

---

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη αξιολογήθηκαν οκτώ (8) στελέχη ζυμών, ως προς την ανάπτυξή τους σε καθορισμένο υπόστρωμα (defined substrate), με κύρια πηγή άνθρακα τη λακτόζη και σε δευτερογενές τυρόγαλα (complex substrate), βασικό παραπροϊόν της παρασκευής τυριών τυρογάλακτος. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ήταν οι ακόλουθοι: *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 (American Type Culture Collection-ATCC, Manassas, Virginia, U.S.A.), *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 (ARS Culture Collection-NRRL, Peoria, Illinois, U.S.A.), *Cryptococcus (Naganishia) uzbekistanensis* NRRL Y-44 (ARS Culture Collection-NRRL, Peoria, Illinois, U.S.A.), *Trichosporon ovoides* ACA-DC 5052 (ACA-DC Collection, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα), *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079 (ACA-DC Collection, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα), *Cutaneotrichosporon cutaneum* NRRL Y-2525 (ARS Culture Collection-NRRL, Peoria, Illinois, U.S.A.), *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536 (ARS Culture Collection-NRRL, Peoria, Illinois, U.S.A.), *Papiliotrema laurentii* NRRL YB-3594 (ARS Culture Collection-NRRL, Peoria, Illinois, U.S.A.).

Οι μικροοργανισμοί διατηρούνται σε διάλυμα γλυκερόλης (50% v/v) και σε συνθήκες κατάψυξης (-18 °C), ενώ για την τακτική τους χρήση αναπτύσσονται σε σωλήνες (slants) με κεκλιμένο στερεό θρεπτικό μέσο YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar), το οποίο εμπεριέχει 10 g/L γλυκόζη (D(+)) Glucose anhydrous, Carlo Erba, Italy), 10 g/L εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract, Condalab, Spain), 10 g/L πεπτόνη (Bacteriological Peptone MC024, LAB M Ltd, U.K.) και 20 g/L άγαρ. Για να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους, πραγματοποιούνται ανανεώσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα, με τα slants, έπειτα, να διατηρούνται σε θερμοκρασία 6 °C.

### 3.2. Μικροβιακή καλλιέργεια ελέγχου (control) σε λακτόζη |

---

#### 3.2.1. Υπόστρωμα προκαλλιέργειας

Ο εμβολιασμός του θρεπτικού υλικού με τον μικροοργανισμό προϋποθέτει την πρότερη καλλιέργεια αυτού σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Peptone Dextrose - Y.P.D., με στόχο οι μικροοργανισμοί να βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης κατά τον εμβολιασμό. Στη μελέτη αυτή το υπόστρωμα της προκαλλιέργειας εμπεριείχε 5 g/L λακτόζη (D-Lactose monohydrate, L254 Sigma-Aldrich, U.S.A.), 5



g/L γλυκόζη, 10 g/L εκχύλισμα ζύμης και 10 g/L πεπτόνη. Σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL προστίθενται, με χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου, 50±1 mL του υποστρώματος, οι φιάλες πωματίζονται με βαμβάκι, για την απρόσκοπτη κυκλοφορία του αέρα και οδηγούνται για αποστείρωση στους 121,1 °C, με χρονική διάρκεια αυτής τα 20 λεπτά. Επακόλουθα, υπό ασηπτικές συνθήκες εντός θαλάμου κάθετης νηματικής ροής (laminar), οι φιάλες εμβολιάζονται με τον μικροοργανισμό και αφήνονται για επώαση σε ανακινούμενο (shaker) επωαστικό θάλαμο (New Brunswick Sc, U.S.A.) για 24 ώρες, υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (30±1 °C) και ανάδευσης 180±5 rpm (στροφές ανά λεπτό). Κατά την επώαση, η αύξηση της θολερότητας του υγρού της καλλιέργειας υποδηλώνει την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού, ο οποίος θα εμβολιαστεί στο θρεπτικό μέσο της κύριας καλλιέργειας.

### **3.2.2. Υπόστρωμα κύριας καλλιέργειας ελέγχου**

Το θρεπτικό υπόστρωμα της κύριας καλλιέργειας ελέγχου περιείχε ως πηγή άνθρακα τη λακτόζη, σε συγκέντρωση 56±1 g/L, για να προσομοιάζει όσο το δυνατόν περισσότερο στην περιεκτικότητα της λακτόζης που υπάρχει στο δευτερογενές τυρόγαλα, το οποίο αξιοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη μελέτη. Η αναλογία άνθρακα προς άζωτο ορίστηκε, βάσει βιβλιογραφίας, στην τιμή 50±1 gC/gN (τροποποιημένο από Carota *et al.*, 2017), με στόχο την ενίσχυση της συσσώρευσης λίπους, λόγω περιορισμένης παρουσίας του αζώτου. Ως πηγή οργανικού αζώτου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης συγκέντρωσης 2,32 g/L και ως πηγή ανόργανου αζώτου χρησιμοποιήθηκε θειικό αμμώνιο (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Ammonium sulfate A4418, Sigma-Aldrich, U.S.A.) συγκέντρωσης 1,09 g/L. Τα απαραίτητα άλατα και ιχνοστοιχεία, που προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο και η συγκέντρωση αυτών, παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Όλα τα συστατικά διαλύονται σε απιονισμένο νερό, αναμιγνύονται και αναδεύονται έως ότου το μίγμα να γίνει διαυγές. Ποσότητα 50±1 mL του υποστρώματος μεταφέρεται σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, αυτές πωματίζονται με βαμβάκι, οδηγούνται προς αποστείρωση στους 121,1 °C και εφόσον η θερμοκρασία κατέλθει περί τους 30 °C, το θρεπτικό είναι έτοιμο προς εμβολιασμό.

**Πίνακας 10.** Καταγραφή των μεταλλικών αλάτων και των συγκεντρώσεων αυτών, όπως εμπεριέχονται στο θρεπτικό υλικό (Papanikolaou *et al.*, 2001).

ΟΥΣΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (g/L)
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,06
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,5
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,02
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,15
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5

### 3.2.3. Εμβολιασμός και συνθήκες επώασης

Σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες, μεταφέρεται 1 mL εμβολίου, από τις φιάλες της προκαλλιέργειας, σε κάθε κωνική φιάλη της κύριας καλλιέργειας. Οι φιάλες τοποθετούνται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο προς επώαση, υπό σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180±5 rpm και θερμοκρασίας(30±1 °C), κατά τον ίδιο τρόπο με τις φιάλες προκαλλιέργειας. Η διάρκεια της ζύμωσης εξαρτάται από την ταχύτητα με την οποία ο μικροοργανισμός αφομοιώνει τα θρεπτικά στοιχεία, έως ότου σταματήσει η ανάπτυξη του, λόγω κάποιου περιοριστικού παράγοντα, με τον συνηθέστερο να είναι η πλήρης κατανάλωση της πηγής άνθρακα. Η τιμή του pH της καλλιέργειας πρέπει να κυμαίνεται στις τιμές 5,5-6, ανάλογα τον μικροοργανισμό. Η μέτρηση του pH πραγματοποιείται με πεχάμετρο (pH/mV meter HI 8014-Hanna Instruments). Σε περιπτώσεις που η τιμή αποκλίνει από τα όρια, πραγματοποιείται ρύθμιση του pH με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος συγκέντρωσης 5 M, όταν η τιμή είναι άνω του ορίου και πρέπει να μειωθεί, ενώ, στην αντίθετη περίπτωση, χρησιμοποιείται διάλυμα καυστικού νατρίου 5 M. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση για τα 2 διαλύματα εξυπηρετεί στη ρύθμιση, χωρίς ουσιαστική αύξηση του όγκου του υγρού της καλλιέργειας.

### 3.3. Μικροβιακή καλλιέργεια σε δευτερογενές τυρόγαλα |

Το δευτερογενές τυρόγαλα, που αξιοποιήθηκε κατά τις συγκεκριμένες πειραματικές διεργασίες, προήλθε από το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, με τη σύσταση και τα στοιχεία του, όπως, και του πρόβειου γάλακτος και του πρωτογενούς τυρογάλακτος, σύμφωνα με τον αναλυτή Milkoscan™ FT 120, FOSS A/S, να καταγράφονται στον Πίνακα 11. Το γάλα, που αξιοποιήθηκε στην τυροκόμηση, ήταν πρόβειο και το τυρί που παρασκευάστηκε ήταν η φέτα, με χρήση πυτιάς (4 g ΠΥΤΙΑ ΤΥΡΟΥ/100kg γάλα, 90% Χυμοσίνη, Βλαχοπούλα Α.Ε., Αθήνα) και καλλιέργειας (7 g λυοφλιωμένης καλλιέργειας/100 kg γάλα, Laboratorio PRODOR, Italy) (Εικόνα 39). Από το προκύπτον (πρωτογενές) τυρόγαλα παρασκευάστηκε μυζήθρα και το παραπροϊόν (δευτερογενές τυρόγαλα), αρχικά, διηθήθηκε δις με χρήση ειδικού πανιού τυροκόμησης (τσαντίλα) για την κατακράτηση συσσωμάτων κροκιδωμένων πρωτεϊνών του ορού και ύστερα αποθηκεύτηκε υπό ψύξη (6 °C) (Εικόνα 40).



**Εικόνα 40.** Η τυροκόμηση της φέτας προϋποθέτει την παστερίωση (α) του γάλακτος (63 °C για 30 λεπτά – Low Temperature Long Time Pasteurization). Το τυρόπηγμα, μετά από 20 λεπτά είναι έτοιμο για τεμαχισμό σε διαστάσεις 2cm\*2cm\*2cm και, μετά από παραμονή 10 λεπτών εντός τυρολέβητα για αποβολή ορού (β), μεταφέρεται προς στράγγιση και σχηματισμό τυριού σε συγκεκριμένα καλούπια (γ).

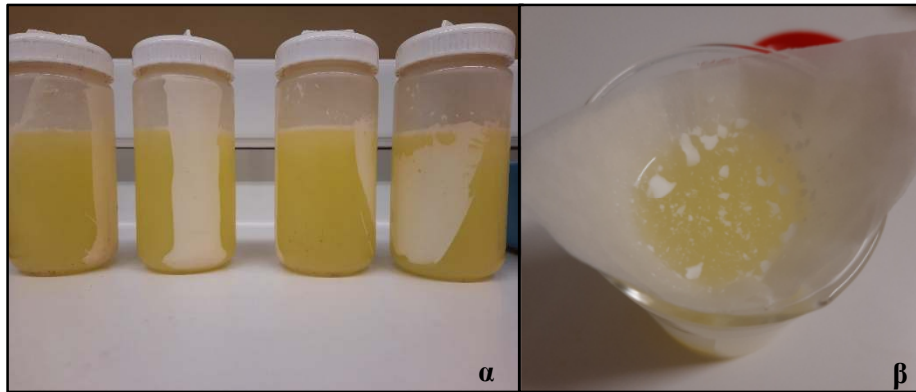
**Πίνακας 11.** Περιεκτικότητα του γάλακτος, του πρωτογενούς και του δευτερογενούς τυρογάλακτος σε λακτόζη, πρωτεΐνη και λίπος (g/100g) σύμφωνα με τον αναλυτή Milkoscan™ FT 120.

	Λακτόζη (g/100g)	Πρωτεΐνη (g/100g)	Λίπος (g/100g)
<b>Γάλα</b>	4,6	5,5	6,4
<b>Πρωτογενές Τυρόγαλα</b>	6,1	1,3	0,2
<b>Δευτερογενές Τυρόγαλα</b>	6,8	0,6	0,2



**Εικόνα 41.** Η τυροκόμηση της μυζήθρας προϋποθέτει τη θέρμανση του πρωτογενούς τυρογάλακτος, προς μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού (α). Σε ειδικό τυρόπανο (τσαντίλα) συγκεντρώνονται οι κροκκιδωμένες πρωτεΐνες και αφήνονται προς στράγγιση (β), ενώ το δευτερογενές τυρόγαλα συλλέγεται (γ) και αποθηκεύεται στους 4 °C, για μετέπειτα χρήση.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συσσώρευση λίπους χωρεί εν τη απουσία αζώτου. Εύκολα γίνεται αντιληπτό ότι η ποσότητα της πρωτεΐνης στο δευτερογενές τυρόγαλα είναι υψηλή και συνεπώς ευνοείται η βιοσύνθεση βιομάζας και όχι λιπιδίων, οπότε πρέπει να υποστεί επεξεργασία. Εν προκειμένω, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο (Sorval Lynx 6000 Label 2, ThermoFisher Scientific) για 10 λεπτά, στις 9000 στροφές και στους 4 °C, με στόχο το διαχωρισμό των κροκκιδωμένων οροπρωτεϊνών από το δευτερογενές τυρόγαλα. Έπειτα, ακολούθησε διήθηση με τετραπλό διηθητικό χαρτί (Εικόνα 41), με τη διαφορά στο χρώμα και στη θολερότητα να είναι εμφανής (Εικόνα 42). Η σύσταση σε συγκεκριμένα διαλυτά στερεά και τα χαρακτηριστικά του τελικού υποστρώματος καταγράφονται στον ακόλουθο Πίνακα 12.



**Εικόνα 42.** Διαχωρισμός των μετουσιωμένων οροπρωτεϊνών από το δευτερογενές τυρόγαλα μέσω φυγοκέντρησης (α) και κατακράτησή τους μέσω διήθησης (β).



**Εικόνα 43.** Το δευτερογενές τυρόγαλα πριν (α) και μετά (β) τη φυγοκέντρηση και διήθηση, με τις διαφορές στο χρώμα και τη θολερότητα να είναι ευκρινείς.

**Πίνακας 12.** Καταγραφή της σύστασης σε συγκεκριμένα στερεά και των χαρακτηριστικών του τελικού υποστρώματος.

	Λακτόζη (g/L)	Πρωτεΐνη* (g/L)	Άζωτο Ελεύθερων Αμινομάδων (mg/L)*	pH
<b>Δευτερογενές Τυρόγαλα</b>	59	1,07	64,0	6,25

\*Η πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη φωτομετρική μέθοδο Bradford, ενώ το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων μέσω της φωτομετρικής μεθόδου της νινυδρίνης, όπως αυτές αναλύονται παρακάτω.

Από το επεξεργασμένο δευτερογενές τυρόγαλα μεταφέρονται  $50 \pm 1$  mL σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, αυτές ποματίζονται με βαμβάκι, οδηγούνται προς αποστείρωση στους  $121,1$  °C και εφόσον η θερμοκρασία κατέλθει περί τους  $30$  °C, το θρεπτικό είναι έτοιμο προς εμβολιασμό. Σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν παραπάνω, σε

θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, εμβολιάζεται 1 mL από την προκαλλιέργεια κάθε μικροοργανισμού, σε 6 κωνικές φιάλες για τον κάθε ένα και οι φιάλες τοποθετούνται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο ανάδευσης ( $180 \pm 5$  rpm) και θερμοκρασίας ( $30 \pm 1$  °C). Η διάρκεια της ζύμωσης εξαρτάται από την ταχύτητα αφομοίωσης του μικροοργανισμού. Η αρχική τιμή του pH είναι 6,25, και, όταν απαιτείται, ρυθμίζεται σε τιμές περί το  $\text{pH}=5,5$  με τα διαλύματα HCl 5 M και NaOH 5 M, υπό ασηπτικές συνθήκες.

### 3.4. Μέθοδοι ανάλυσης |

---

#### 3.4.1. Ποσοτικός προσδιορισμός βιομάζας

Η βιομάζα, που αναπτύσσεται στην καλλιέργεια, πρέπει να διαχωριστεί από το θρεπτικό υγρό, να καθαριστεί από υπολείμματα αυτού, να αφηθεί προς ξήρανση και έπειτα να προσδιοριστεί ποσοτικά μέσω ζύγισης. Το όλον του υγρού της καλλιέργειας μεταφέρεται σε ειδικούς σωλήνες (falcon tubes) και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά, στις 9000 στροφές και στους  $4 \square$  σε φυγοκεντρικό διαχωριστήρα τύπου Universal 320R Hettich Zentrifugen. Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και η βιομάζα, ως ίζημα, επαναδιαλυτοποιείται σε απιονισμένο νερό και ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντριση, υπό τις ίδιες συνθήκες. Το προκύπτον ίζημα μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια τύπου McCartney, τα οποία τοποθετούνται σε φούρνο τύπου Gallenkamp Oven BS OV-160 προς ξήρανση στους  $80 \square$  για 24 ώρες. Μετά το πέρας της ξήρανσης, τα φιαλίδια με την αποξηραμένη βιομάζα επαναζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό τύπου KERN EW 420-3NM και από τη διαφορά προκύπτει το καθαρό βάρος της βιομάζας, προερχόμενη από τα 50 mL του υγρού της καλλιέργειας και η οποία ανάγεται σε ποσότητα βιομάζας ανά λίτρο υγρού καλλιέργειας (g/L).

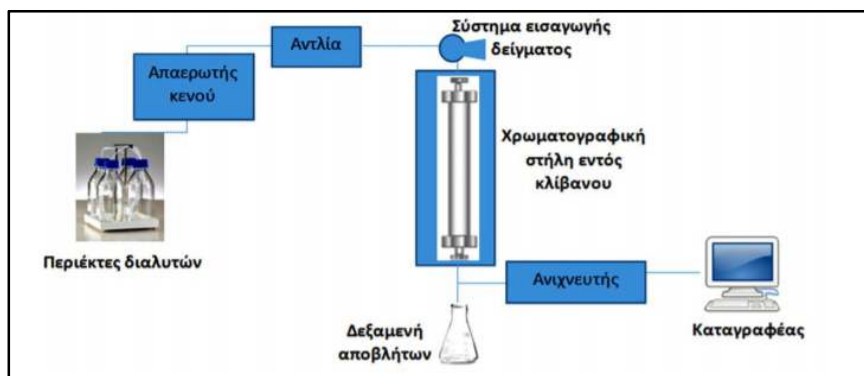
#### 3.4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός καταναλωθείσας λακτόζης

Η καταναλωθείσα λακτόζη προκύπτει ως η διαφορά συγκέντρωσης της εναπομένουσας λακτόζης για δεδομένη χρονική στιγμή ως προς τη συγκέντρωση σε λακτόζη του αρχικού υποστρώματος. Ο προσδιορισμός της λακτόζης, που απομένει κάθε χρονική στιγμή στο υγρό της καλλιέργειας, πραγματοποιείται μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, H.P.L.C.) (Εικόνα 43), σε υγρό χρωματογράφο τύπου Shimadzu, εξοπλισμένο με

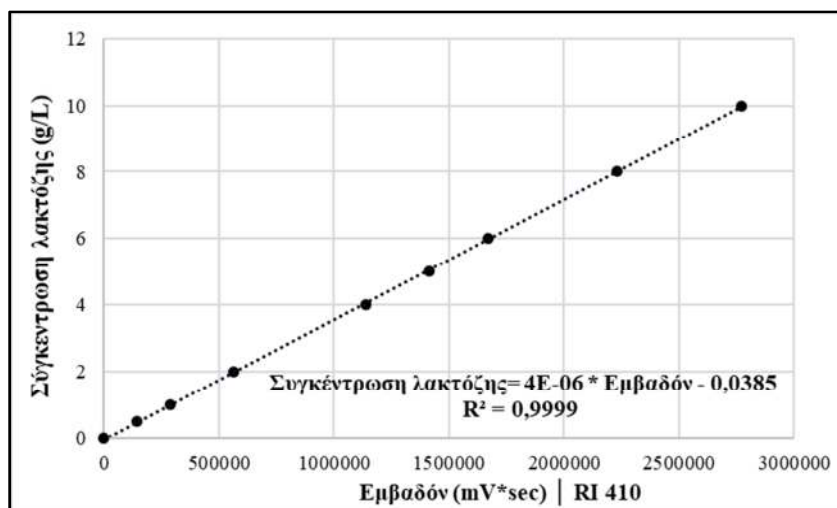


ανιχνευτές U.V. και R.I. (2414 Refractive Index (R.I.) Detector), ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό. Η χρησιμοποιούμενη διαχωριστική στήλη είναι τύπου ROA-Organic Acid  $H^+$  (Phenomenex) και το διάλυμα, που χρησιμοποιείται ως κινητή φάση, με ροή 0,5 mL/min, είναι υδατικό διάλυμα θειϊκού οξέος,  $H_2SO_4$  10 mM, με θερμοκρασία στήλης τους 60 °C. Ο όγκος του προς ανάλυση δείγματος ορίζεται στα 20  $\mu$ L και ο χρόνος ανάλυσης στα 30 λεπτά. Το δείγμα, προτού εισέλθει στο ειδικό φιαλίδιο της HPLC, αραιώνεται και φιλτράρεται μέσω φίλτρων Whatman, διαμέτρου 0,22  $\mu$ m.

Η ταυτοποίηση της λακτόζης πραγματοποιείται με βάση το χρόνο κατακράτησης της ουσίας στη στήλη, συγκρινόμενο με το χρόνο κατακράτησης της πρότυπης ουσίας. Η ποσοτικοποίηση προκύπτει από το εμβαδόν της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος και με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς προκύπτει η συγκέντρωση της λακτόζης (g/L). Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις λακτόζης, των οποίων η συγκέντρωση ήταν γνωστή και προσδιορίστηκε το εμβαδόν, που αντιστοιχεί σε κάθε συγκέντρωση, μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Εικόνα 44). Σε περίπτωση που το δείγμα έχει αραιωθεί, προκειμένου το αποτέλεσμα της H.P.L.C. να βρίσκεται εντός των ορίων της πρότυπης καμπύλης, η συγκέντρωση πολλαπλασιάζεται επί το συντελεστή αραιώσης, για να προκύψει η πραγματική τιμή της λακτόζης, που παραμένει στο υγρό της ζύμωσης. Η εναπομένουσα, για τη δεδομένη χρονική στιγμή, λακτόζη (g/L) υπολογίζεται από την αφαίρεση της τιμής για την καταναλωθείσα λακτόζη από την αρχική τιμή αυτής.



**Εικόνα 44.** Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.

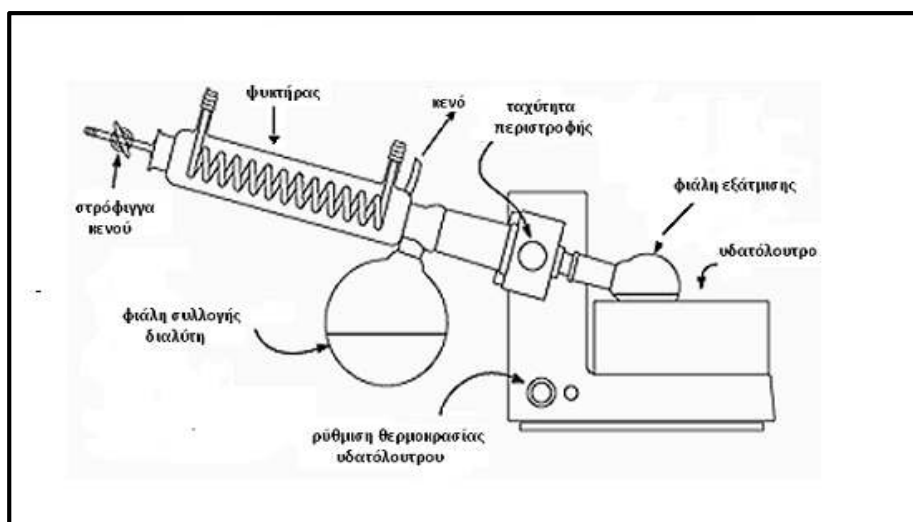


**Εικόνα 45.** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το δισακχαρίτη λακτόζη, με την εξίσωση να προκύπτει με βάση το γραμμικό μοντέλο και συντελεστή προσδιορισμού  $R^2=0,999$ .

### 3.4.3. Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Η ποσότητα του ενδοκυτταρικού λίπους, που παράγει ο μικροβιακός πληθυσμός εκχυλίζεται από τη λοιπή βιομάζα και προσδιορίζεται, ακολουθώντας την κάτωθι διαδικασία:

- Η ξηρή βιομάζα, που εμπεριέχεται εντός του φιαλιδίου τύπου McCartney, κονιορτοποιείται και προστίθεται μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης, αναλογίας 2:1 (Folch *et al.*, 1957; Papanikolaou *et al.*, 2001; Sarantou *et al.*, 2021). Το φιαλίδιο με το μίγμα διαλύματος-βιομάζας σφραγίζεται αεροστεγώς και φυλάσσεται στο σκοτάδι για τουλάχιστον 72 ώρες, προκειμένου να εκχυλιστεί το λίπος, ενώ, ταυτόχρονα, αποφεύγεται η φωτο-ξείδωση των λιπαρών οξέων αυτού.
- Μετά το πέρας της συγκεκριμένης χρονικής περιόδου, το μίγμα διηθείται, με χρήση διηθητικού χαρτιού προς απομάκρυνση των στερεών, εντός προζυγισμένης σφαιρικής φιάλης εξάτμισης.
- Η σφαιρική φιάλη οδηγείται προς εξάτμιση υπό κενό και σε θερμοκρασία περί τους 50 °C σε περιστροφικό εξάτμιστήρα τύπου Flash Evaporator - Rotavapor R - 114 (Εικόνα 45) με σκοπό την απομάκρυνση των πτητικών διαλυτών και την απομόνωση του μικροβιακού λίπους.



**Εικόνα 46.** Σχηματική απεικόνιση του περιστροφικού εξατμιστήρα για εξάτμιση διαλυμάτων υπό κενό και ρυθμιζόμενη θερμοκρασία.

- Η σφαιρική φιάλη επαναζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό και από τη διαφορά προκύπτει η μάζα του λίπους, προερχόμενη από τα 50 mL του υγρού της καλλιέργειας και η οποία ανάγεται σε ποσότητα λίπους ανά λίτρο υγρού καλλιέργειας (g/L).

### 3.4.4. Ποιοτικός προσδιορισμός κλασμάτων λιπιδίων

Για τον προσδιορισμό των κλασμάτων του παραγόμενου μικροβιακού λίπους χρησιμοποιείται η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, T.L.C.). Ειδικές πλάκες οξειδίου του πυριτίου Silica Gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany), διαστάσεων 20 cm \* 20 cm χρησιμοποιούνται ως πολική στατική φάση, διαμέσου της οποίας, λόγω τριχοειδών φαινομένων, θα διέλθει η άπολη κινητή φάση, συμπαρασύροντας τα μη-πολικά και ουδέτερα λιπίδια του δείγματος. Στο κάτω τμήμα του χρωματογραφήματος απαντώνται τα πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια).

Η χρήση της πλάκας προϋποθέτει τον καθαρισμό και την ενεργοποίησή της. Για τον καθαρισμό, οι διαλύτες είναι χλωροφόρμιο-μεθανόλη 200 mL και διατρέχουν όλη την πλάκα, ενώ η ενεργοποίηση αντιστοιχεί σε θέρμανση στους 120 °C για 30 λεπτά, έτσι ώστε να είναι έτοιμη για την ένεση των πρότυπων διαλυμάτων και των δειγμάτων. Από το ενδοκυτταρικό λίπος, που απομονώθηκε κατά την εξάτμιση του αντιδραστήριου Folch (Εδάφιο 3.4.3), παραλαμβάνεται ποσότητα 30 μg και επαναδιαλύεται σε 1 ml εξανίου. Από το δείγμα αυτό ενίονται 20 μL με μικροσύριγγα (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) σε συγκεκριμένο σημείο της στατικής φάσης, σε

απόσταση 2 cm από το κάτω άκρο της πλάκας. Ίδια ποσότητα ενίεται και από τα πρότυπα διαλύματα και συγκεκριμένα χοληστερόλη, για την ομάδα των στερολών, ελαιϊκό οξύ για την ομάδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων και ελαιόλαδο για την ομάδα των τριακυλογλυκερολών, πλούσιο στο τριγλυκερίδιο τριελαΐνη. Μεταξύ των σημείων ένεσης, μεσολαβεί απόσταση 2 cm.

Η κινητή φάση αποτελείται από εξάνιο/διαιθυλαιθέρα/οξικό οξύ (70:30:1, v/v/v) και προστίθεται εντός γυάλινου θαλάμου ανάπτυξης, ο οποίος βρίσκεται σε απαγωγό εστία και καλύπτεται, προς αποφυγή της εξάτμισης της κινητής φάσης. Η ποσότητα δεν υπερβαίνει τα 2 cm από την κάτω επιφάνεια της στήλης. Εντός του θαλάμου τοποθετείται διηθητικό χαρτί, εμποτισμένο με το διαλύτη, έτσι ώστε να υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή των ατμών αυτού. Όταν αυτή επιτευχθεί, εισάγεται η πλάκα με τα δείγματα εντός του θαλάμου. Το μέτωπο του διαλύτη θα διανύσει απόσταση έως 2 cm πριν το άνω μέρος της πλάκας, όπου και θα τερματιστεί η ανάλυση, με χρονική διάρκεια περί τα 30-45 λεπτά. Μετά το πέρας της ανάπτυξης τους διαλύτη κατά μήκος, η πλάκα αφήνεται για 30 λεπτά να στεγνώσει στην απαγωγό εστία και ύστερα μεταφέρεται σε θάλαμο ιωδίου, προς απεικόνιση των κλασμάτων των λιπιδίων, ως κηλίδες στο χρωματογράφημα. Η ταυτοποίησή τους εξαρτάται από το συντελεστή κατακράτησης (Retention Factor,  $R_f$ ) και τη σύγκριση αυτού με τους χρόνους κατακράτησης των κλασμάτων πρότυπων διαλυμάτων. Ως συντελεστής κατακράτησης των λιπιδικών κλασμάτων ορίζεται η απόσταση που διένυσε η ουσία (απόσταση του κέντρου της κηλίδας από το σημείο της ένεσης) προς τη συνολική απόσταση που διένυσε το μέτωπο του διαλύτη,

$$R_f = \frac{\text{Απόσταση που διένυσε η ουσία}}{\text{Απόσταση που διένυσε το μέτωπο του διαλύτη}}$$

### **3.4.5. Ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων**

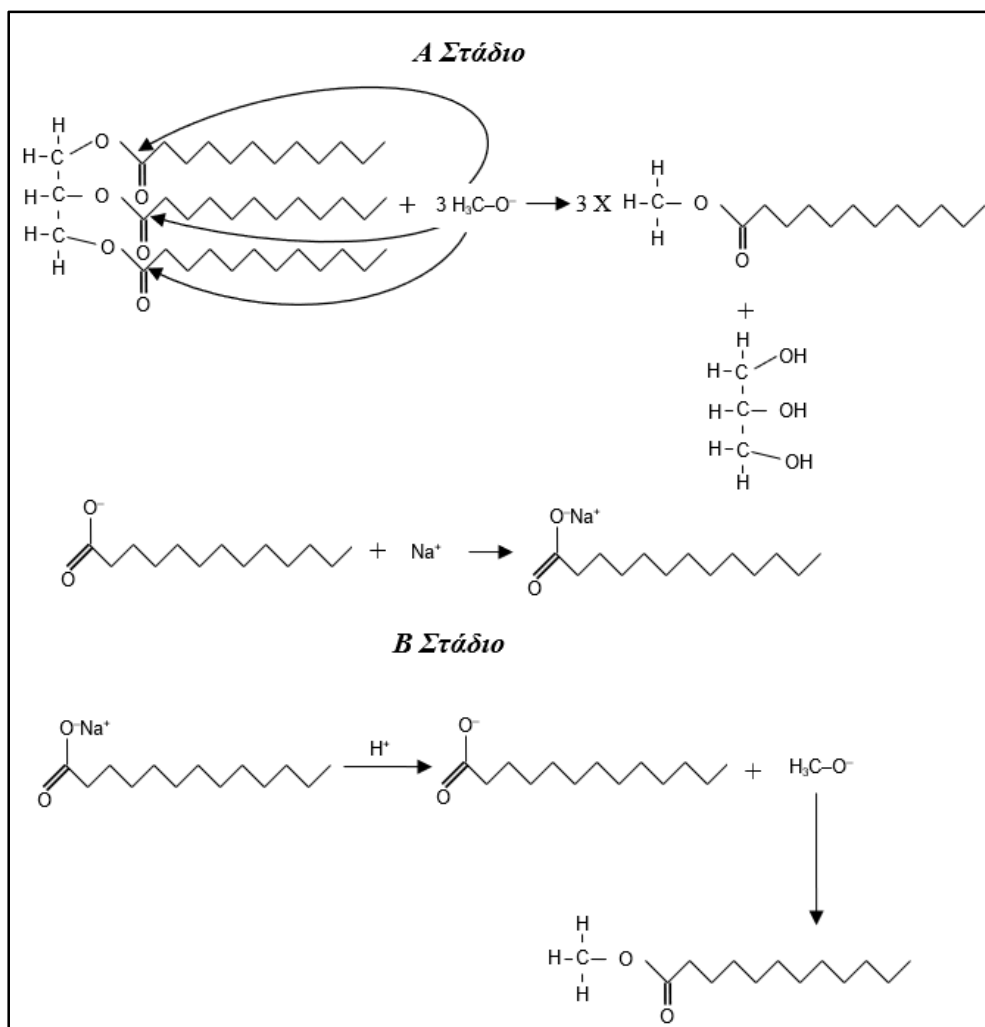
Η ποιοτική ανάλυση του λίπους προϋποθέτει τη μετατροπή των λιπαρών οξέων σε μεθυλικούς εστέρες (F.A.M.E.), οι οποίοι είναι πτητικότεροι και, άρα, κατάλληλοι για να αναλυθούν μέσω αέριας χρωματογραφίας, ώστε να γίνει ο ποιοτικός προσδιορισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα, μέσω της μεθόδου A.F.N.O.R. (A.F.N.O.R., 1984).

#### ▪ Παρασκευή μεθυλικών εστέρων συνολικών μικροβιακών λιπιδίων

Η αντίδραση μεθυλεστεροποίησης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη γενικευμένη μέθοδο από Parapanikolaou *et al.* (2001). Η εν λόγω μέθοδος υπερτερεί έναντι άλλων λιγότερο χρονοβόρων μεθόδων, διότι αποτρέπει την μετατροπή των *cis* ισομερών των λιπαρών οξέων σε *trans*, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν απαντούν στα μικροβιακά λιπίδια. Πρόκειται για μία διαδικασία η οποία τελείται σε δύο διακριτά στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο. Στο πρώτο εξ' αυτών πραγματοποιείται πυρηνόφυλη υποκατάσταση στο μόριο των γλυκεριδίων (μονο-, δι-, τρι- γλυκεριδίων, πολικών λιπιδίων), με τελικά προϊόντα τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα προϋπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με διάλυμα μεθοξειδίου του νατρίου ( $\text{NaOCH}_3$ ) [Διάλυμα μεθοξειδίου του νατρίου: Σε 100 mL μίγματος μεθανόλης/βενζολίου, 70/30 (v/v) προστίθεται υπό ανάδευση 1 g μεταλλικού νατρίου. Η αντίδραση είναι ισχυρώς εξώθερμη. Μετά την πλήρη διάλυση του νατρίου προστίθεται φαινολοφθαλεΐνη ως δείκτης pH. προς σχηματισμό σαπώνων]. Η δημιουργία *trans* ισομερών αποτρέπεται σε αλκαλικό περιβάλλον. Σε επόμενο στάδιο, οι σχηματιζόμενοι σάπωνες θα μετατραπούν σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα τελευταία, αντιδρώντας με μεθανόλη [Διάλυμα υδροχλωρικής μεθανόλης: Σε 125 mL μεθανόλης προστίθεται στάγδην 10 mL ακετυλοχλωριδίου (Fluka) (ισχυρά εξώθερμη αντίδραση)] μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα πραγματοποιούνται σε δυο στάδια και περιγράφονται ακολούθως (Εικόνα 46).

Εντός των σφαιρικών φιαλών, που εμπεριέχουν το απομονωθέν ενδοκυτταρικό λίπος, προστίθενται μερικά θραύσματα πορώδους κεραμικού υλικού προς ομαλοποίηση του βρασμού και 10 mL μεθοξειδίου του νατρίου, με το δείγμα να φέρεται εις βρασμόν σε σύστημα μανδύα βρασμού - συμπυκνωτή περί τα 20 λεπτά και ενώ έχει τοποθετηθεί κάθετος ψυκτήρας στο στόμιο της φιάλης. Έπειτα, ακολουθεί βρασμός ίδιας χρονικής διάρκειας, εφόσον πρωτίστως προστίθεται στο μίγμα υδροχλωρική μεθανόλη ( $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{OH}$ ), έως ότου το pH του μίγματος να γίνει όξινο, αλλαγή που γίνεται ορατή λόγω αποχρωματισμού. Μετά το πέρας και του δεύτερου βρασμού, προστίθεται απιονισμένο νερό προς παύση της αντίδρασης. Το μίγμα απομακρύνεται από το μανδύα και προστίθενται σε αυτό 6 mL εξάνιο ( $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ). Το όλον

οδηγείται σε διαχωριστική χοάνη προς διαχωρισμό της υδατικής φάσης (κάτω), που απορρίπτεται, από την οργανική φάση (άνω), η οποία εμπεριέχει το εξάνιο και τους μεθυλεστερές των λιπαρών οξέων. Η επιθυμητή αυτή φάση συλλέγεται σε φιαλίδιο, που περιέχει άνυδρο θειϊκό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) για απορρόφηση της υπολειπόμενης υγρασίας και διατηρείται στην κατάψυξη ( $-18\text{ }^\circ\text{C}$ ).



**Εικόνα 47.** Αντίδραση μεθυλεστεροποίησης η οποία τελείται σε δύο διακριτά στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο.

### ▪ Αέριος Χρωματογραφία

Ο ποιοτικός προσδιορισμός της σύστασης του μικροβιακού λίπους σε επιμέρους λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε από αέριο χρωματογράφο Fisons 8060, εξοπλισμένο με τριχοειδή στήλη CPWAX 52 CB (διαστάσεων 60m x 0,32mm) και με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, F.I.D.), θερμοκρασίας  $250\text{ }^\circ\text{C}$ . Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται το ήλιον ( $\text{He}$ ), με ροή αερίου  $2\text{ mL/min}$ , σε θερμοκρασία  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Ο φούρνος θερμαίνεται από τους  $50\text{ }^\circ\text{C}$  στους  $200\text{ }^\circ\text{C}$  (παραμένει για  $1\text{ min}$ ) με



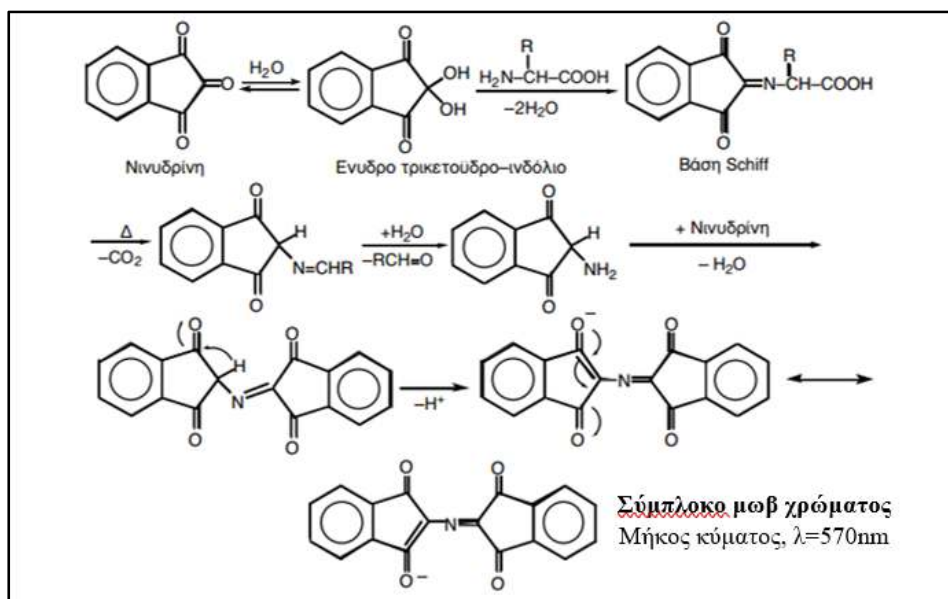
ρυθμό 25 °C/min, έπειτα στους 240 °C με ρυθμό 3 °C/min και τέλος στους 250 °C (παραμένει για 5 min) με ρυθμό 25 °C/min. Στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου ενίεται 1 μL δείγματος, όπως αυτό αποθηκεύτηκε σε φιαλίδιο βάσει όσων αναφέρθηκαν κατά τη μεθυλεστεροποίηση, με ειδική μικροσύριγγα των 10 μL (Hamilton, Bonaduz, Switzerland), εφόσον προηγηθεί έκπλυσή της με εξάνιο. Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων βασίζεται σε πρότυπες καμπύλες μεθυλεστέρων των κύριων λιπαρών οξέων, αντιστοιχίζοντας το χρόνο κατακράτησης ( $t_R$ ) της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος, στο ανάλογο λιπαρό οξύ, που αντιστοιχεί στον ίδιο χρόνο. Η ποσοστιαία αναλογία του κάθε λιπαρού οξέος ως προς το σύνολο αυτών, προκύπτει από το εμβαδόν της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος, ως προς το συνολικό εμβαδόν όλων των κορυφών, με βάση την κάτωθι σχέση:

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

### 3.4.6. Ποσοτικός προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, α-αμινοξέων ή αμινοτελικών άκρων πεπτιδίων και πρωτεϊνών, προσδιορίζεται μέσω της φωτομετρικής μεθόδου της νινυδρίνης. Η νινυδρίνη (2,2-διϋδροξυϊνδανο-1,3-διόνη) είναι μια χημική ουσία κίτρινου χρώματος, που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αμμωνίας ή πρωτοταγών και δευτεροταγών αμινών. Όταν αντιδρά με αυτές τις ελεύθερες αμίνες, παράγεται ένα βαθύ μπλε ή μωβ χρώμα (Εικόνα 47), όπως πρωτοαναφέρθηκε από τον Siegfried Ruhemann (1910). Η μέθοδος είναι απλή στη χρήση, χαμηλού κόστους και μικρής χρονικής διάρκειας, ιδανική για αναλύσεις ρουτίνας, με διάφορες παραλλαγές και βελτιώσεις να έχουν χρησιμοποιηθεί, λόγω της απαίτησης φθηνού εξοπλισμού και αναλωσίμων (Friedman, 2004).

Για να παραχθεί το χρωμοφόρο νινυδρίνης (2-(1,3-διοξοϊνδαν-2-υλ) ιμινοϊνδαν-1,3-διόνης), η αμίνη συμπυκνώνεται με ένα μόριο νινυδρίνης. Η νινυδρίνη συνδέεται μέσω του ατόμου οξυγόνου της στο αμινοτελικό άκρο του αμινοξέος, για να δώσει μια βάση Schiff. Έτσι, μόνο η αμμωνία και οι πρωτοταγείς αμίνες μπορούν να προχωρήσουν πέρα από αυτό το βήμα και να δώσουν το μωβ του Ruhemann, το οποίο έχει μέγιστο απορρόφησης στα 570 nm.

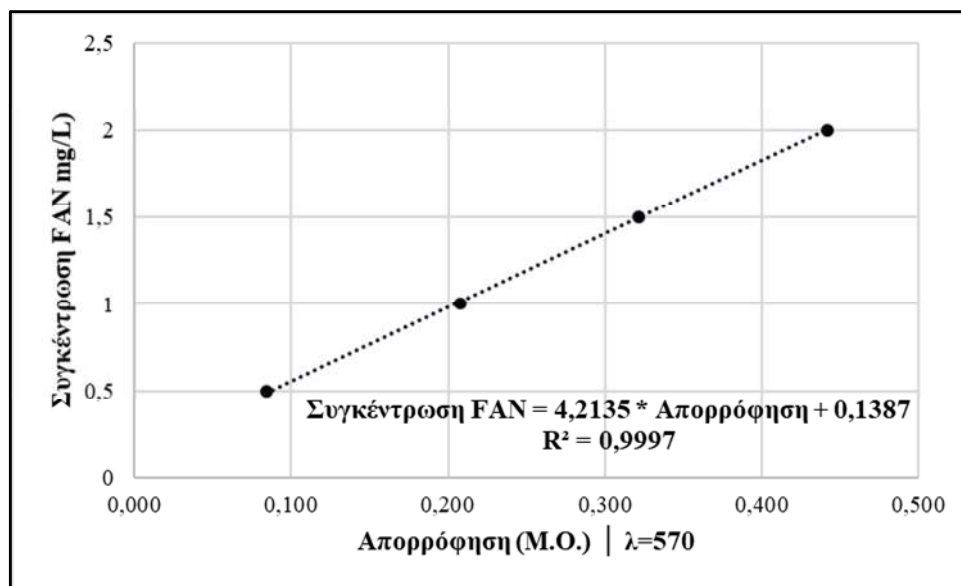


**Εικόνα 48.** Συνοπτική απεικόνιση των αντιδράσεων της νινυδρίνης το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων, προς σχηματισμό του συμπλόκου, μωβ χρώματος (τροποποιημένο από Ανδρικόπουλος, 2015).

Η διαδικασία της ανάλυσης πραγματοποιείται εις διπλούν για κάθε δείγμα. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 1 mL από κατάλληλα αραιωμένο δείγμα, 0,5 mL αντιδραστήριου χρώσης, που περιέχει τη νινυδρίνη [Αντιδραστήριο χρώσης: 49,71 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5 g νινυδρίνης, 3 g φρουκτόζη, περί τα 60 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  για ρύθμιση pH και  $d\text{H}_2\text{O}$  έως τελικού όγκου 1 L] και μετά από καλή ανάδευση σε vortex, οι σωλήνες πωματίζονται και οδηγούνται προς βρασμό για 16 λεπτά. Μετά το πέρας αυτών, ακολουθεί ψύξη σε πάγο για 20 λεπτά και προσθήκη του αντιδραστήριου αραιώσης [Αντιδραστήριο αραιώσης: 2 g  $\text{KIO}_3$  διαλύονται σε 616 mL  $d\text{H}_2\text{O}$  και προστίθενται 384mL αιθανόλης, έως τελικού όγκου 1 L] με επαρκή ανάδευση 20 δευτερολέπτων. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται 1 mL απιονισμένου νερού.

Η απορρόφηση μετρείται σε μήκος κύματος  $\lambda=570\text{ nm}$  με φασματοφωτόμετρο (Hitachi U.2000 Spectrophotometer). Με βάση την απορρόφηση και την πρότυπη καμπύλη αναφοράς προκύπτει η συγκέντρωση του αζώτου (mg/L). Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις γλυκίνης (από Πρότυπο Διάλυμα Γλυκίνης - ΠΔΓ), των οποίων η συγκέντρωση ήταν γνωστή [0,1072 g γλυκίνης διαλύονται σε 100 mL  $d\text{H}_2\text{O}$  (Αποθεματικό Διάλυμα Γλυκίνης - ΑΔΓ) και 1 mL από το ΑΔΓ επαναδιαλυτοποιείται σε 100 mL  $d\text{H}_2\text{O}$ , σχηματίζοντας το ΠΔΓ, με συγκέντρωση F.A.N. 2 mg/L] και προσδιορίστηκε η απορρόφηση, που αντιστοιχεί σε κάθε επιμέρους γνωστή συγκέντρωση (Εικόνα 48). Σε περίπτωση που το δείγμα έχει αραιωθεί, προκειμένου το αποτέλεσμα της μεθόδου να βρίσκεται εντός των ορίων της

πρότυπης καμπύλης, η συγκέντρωση πολλαπλασιάζεται επί το συντελεστή αραιώσης, για να προκύψει η πραγματική τιμή.



**Εικόνα 49.** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς F.A.N. με βάση το αμινοξύ γλυκίνη, που φέρει μια ελεύθερη αμινομάδα, με την εξίσωση να προκύπτει με βάση το γραμμικό μοντέλο και συντελεστή προσδιορισμού  $R^2=0,999$ .

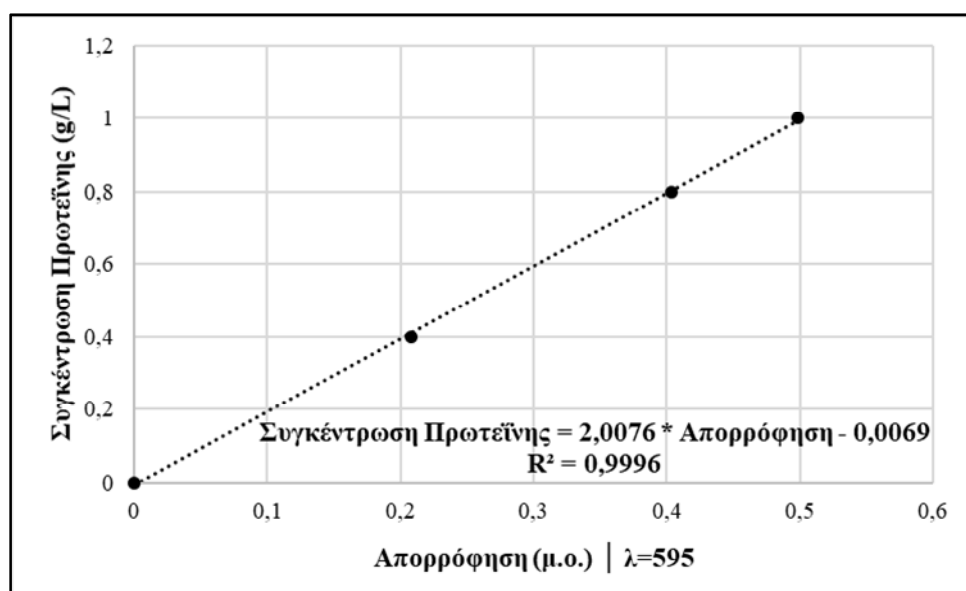
### 3.4.7. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών βασίζεται στη φωτομετρική μέθοδο Bradford (1976) και στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα, όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες. Η μέθοδος συνδυάζει την απλότητα και τον ελάχιστο χρόνο, με καλή ακρίβεια αποτελεσμάτων και ευαισθησία μεταξύ 5 έως 100 μg πρωτεΐνης. Υπό όξινες συνθήκες, η κατιονική καφέ μορφή της χρωστικής (απορρόφηση στα  $\lambda=465$  nm) μετατρέπεται στην ανιονική κυανή της μορφή και συμπλοκοποιείται με την πρωτεΐνη. Εάν δεν υπάρχει πρωτεΐνη να δεσμευτεί, τότε η χρωστική θα παραμείνει καφέ. Λόγω υδρόφοβων και ιοντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σουλφονικών ομάδων της χρωστικής και των θετικά φορτισμένων αμινοξέων (λυσίνη, αργινίνη, ιστιδίνη), η ανιονική μορφή σταθεροποιείται και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίζεται μέσω φωτομέτρησης.

Το προς προσδιορισμό δείγμα αραιώνεται κατάλληλα, έτσι ώστε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να κυμαίνεται μεταξύ των προαναφερθέντων ορίων (5-100 μg). Η διαδικασία της ανάλυσης πραγματοποιείται εις διπλούν για κάθε δείγμα. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 100 μL από το αραιωμένο δείγμα και 5mL από το αντιδραστήριο χρώσης [100mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL Αιθανόλη

95%, 100 mL Φωσφορικό οξύ 85%, ddH<sub>2</sub>O έως τελικού όγκου 1 L], το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται για 5 λεπτά, έως ότου ολοκληρωθεί η αντίδραση. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιούνται 100 μL απιονισμένου νερού.

Η απορρόφηση μετρείται σε μήκος κύματος  $\lambda=595$  nm με φασματοφωτόμετρο (Hitachi U.2000 Spectrophotometer). Με βάση την απορρόφηση και την πρότυπη καμπύλη αναφοράς προκύπτει η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (mg/L). Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις αλβουμίνης (B.S.A.), των οποίων η συγκέντρωση ήταν γνωστή και προσδιορίστηκε η απορρόφηση, που αντιστοιχεί σε κάθε γνωστή συγκέντρωση (Εικόνα 49). Σε περίπτωση που το δείγμα έχει αραιωθεί, η συγκέντρωση πολλαπλασιάζεται επί το συντελεστή αραιώσης, για να προκύψει η πραγματική τιμή.



**Εικόνα 50.** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Πρωτεΐνης, με βάση την αλβουμίνη του ορού βοδινού (B.S.A.), με την εξίσωση να προκύπτει με βάση το γραμμικό μοντέλο και συντελεστή προσδιορισμού  $R^2=0,999$ .

## 4. Αποτελέσματα

## 4.1. Καλλιέργεια ελέγχου σε λακτόζη |

Η πρώτη σειρά πειραμάτων αυτής της μελέτης αφορούσε την καλλιέργεια των στελεχών ζυμών στο ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη λακτόζη, με σκοπό τον έλεγχο της ανάπτυξης και της κινητικής τους. Οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με λόγο C/N=50 g/g και περιεκτικότητα σε λακτόζη  $56 \pm 1$  g/L, τιμή που προσεγγίζει τη συγκέντρωση της λακτόζης στο δευτερογενές τυρόγαλα. Κατ' επέκτασιν, οι πηγές αζώτου, εκχύλισμα ζύμης και θειικό αμμώνιο, ρυθμίστηκαν κατάλληλα στα 2,32 g/L και 1,09 g/L, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα μεταλλικά στοιχεία του θρεπτικού μέσου αναγράφονται στον πίνακα 10.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων προσδιορίστηκε η μη-καταναλωθείσα λακτόζη, το ολικό ξηρό βάρος της βιομάζας (Total Dry Weight, T.D.W.), το παραχθέν λίπος, το pH, ο συντελεστής απόδοσης ή συντελεστής μετατροπής του υποστρώματος προς βιομάζα,  $Y_{S}^X$ , ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S}^P$ , η παραγωγικότητα της ξηρής βιομάζας,  $P_X$ , η παραγωγικότητα του προϊόντος,  $P_L$ , και η περιεκτικότητα της ξηρής βιομάζας σε λίπος,  $K_{X}^P$ . Τα αποτελέσματα καταγράφονται, συγκεντρωτικά, στον ακόλουθο Πίνακα 13 και αναλύονται, ξεχωριστά, στη συνέχεια.

**Πίνακας 13.** Καταγραφή των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας των 8 ελαιογόνων ζυμών στο ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα, με λακτόζη ως πηγή άνθρακα.

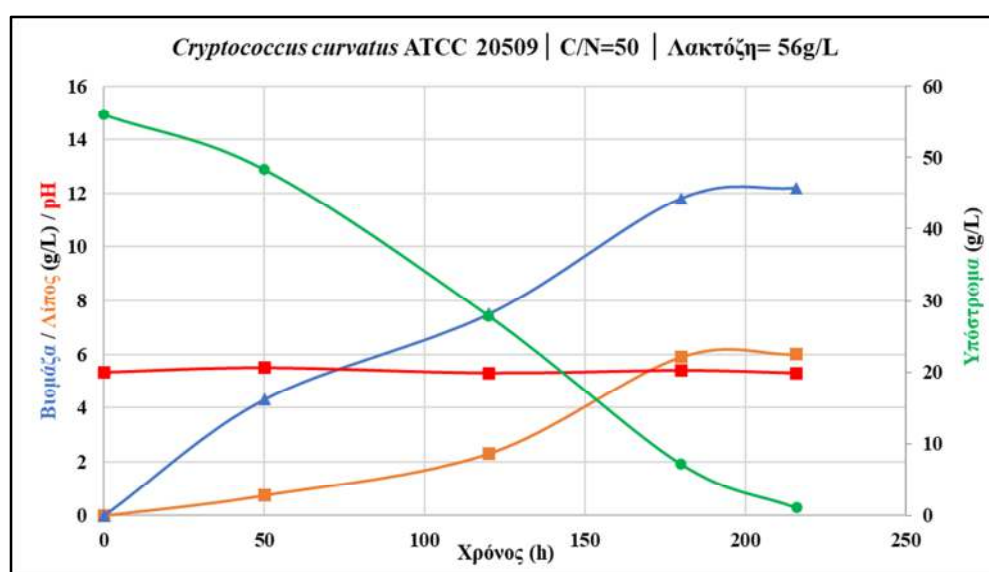
Μικροοργανισμός	Time	pH	Καταναλωθέν Υπό.	Βιομάζα	Λίπος	YX/S	YP/S	KP/X	PX	PL
	(h)		Scou (g/L)							
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	216	5,3	54,9	12,2	6,0	0,23	0,11	0,49	0,06	0,028
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	92	5,3	41,5	12,1	0,8	0,30	0,02	0,10	0,10	0,008
<i>Cryptococcus (Naganishia) uzbekistanensis</i> NRRL Y-44	115	6,3	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon ovoides</i> ACA-DC 5052	115	6,4	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> ACA-DC 5079	115	5,3	27,8	5,1	0,6	0,19	0,02	0,12	0,04	0,005
<i>Cutaneotrichosporon cutaneum</i> NRRL Y-2525	115	6,3	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL Y-2536	92	5,0	40,5	13,2	1,5	0,33	0,04	0,11	0,14	0,020
<i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL YB-3594	115	5,4	54,7	12,9	1,2	0,24	0,02	0,09	0,11	0,010



#### 4.1.1. Καλλιέργεια του *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509



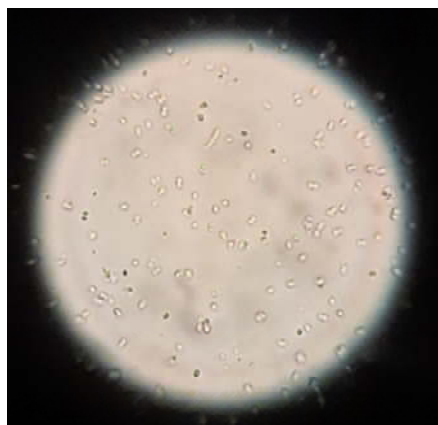
**Εικόνα 51.** Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x40), με ευκρινές το αποθηκευμένο λίπος σε ελαιοσταγονίδια εντός του κυττάρου (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).



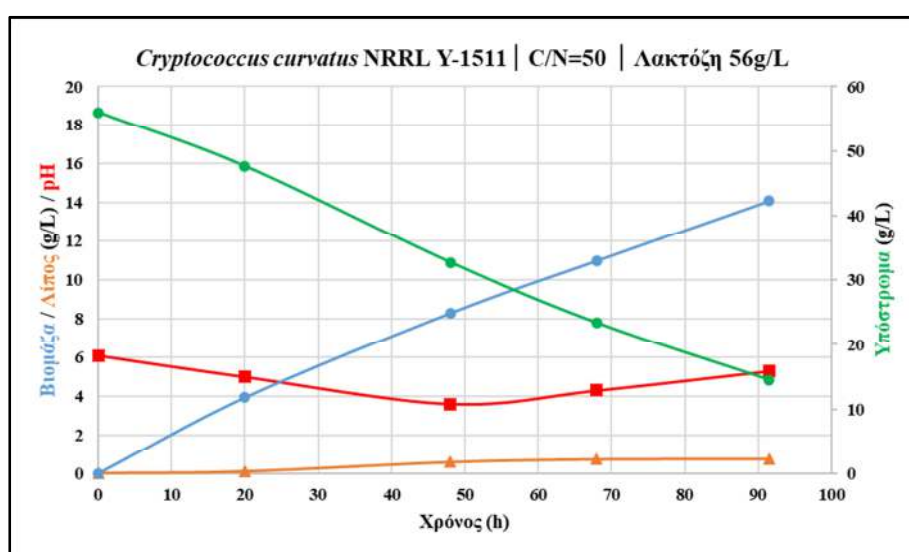
**Εικόνα 52.** Κινητική ανάπτυξης του *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.

Ο μικροοργανισμός *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 (Εικόνα 50), σύμφωνα με το γράφημα της Εικόνας 51, κατανάλωσε το σύνολο του θρεπτικού υλικού, σε μια καλλιέργεια διάρκειας 216 ωρών. Η βιομάζα ανήλθε στα 12,2 g/L και το λίπος στα 6 g/L, με την περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{X}^P$ , να ισούται με  $0,49 \frac{\text{g λίπους}}{\text{g βιομάζας}}$ . Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_S^X=0,23 \frac{\text{g βιομάζας}}{\text{g υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_S^P=0,11 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,06 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,028 g/L/h. Η τιμή του pH δε χρειάστηκε ρύθμιση κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

#### 4.1.2. Καλλιέργεια του *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511



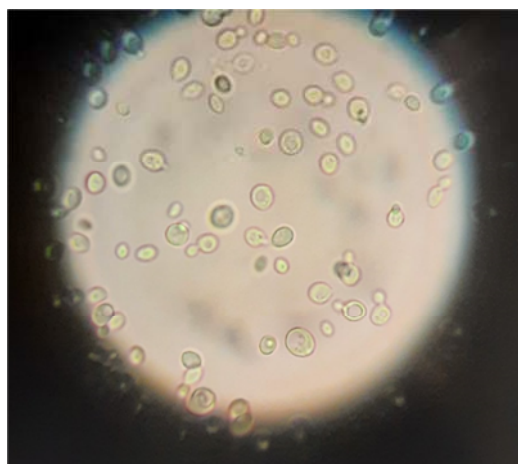
**Εικόνα 53.** Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x40) (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).



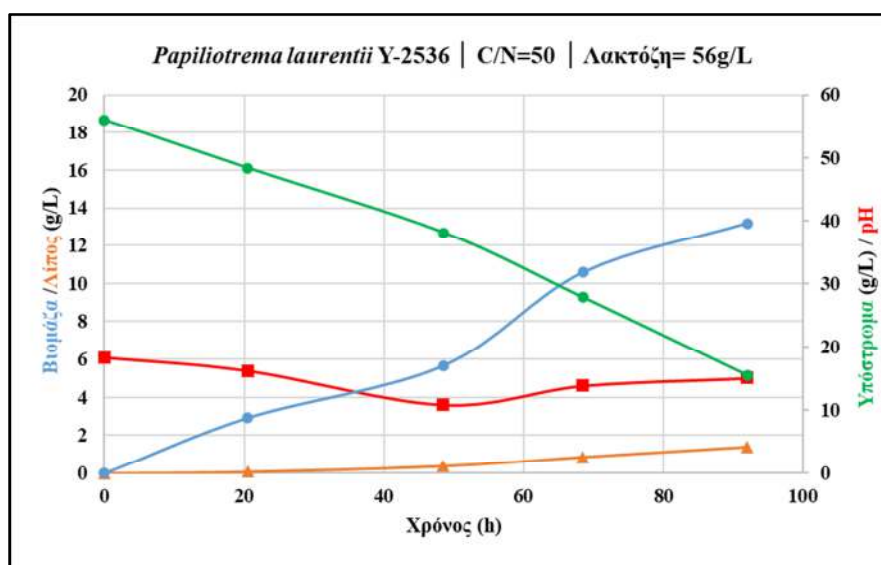
**Εικόνα 54.** Κινητική ανάπτυξης του *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.

Όπως παρατηρείται στο γράφημα της Εικόνας 53, ο μικροοργανισμός *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 (Εικόνα 52), δεν κατανάλωσε το σύνολο του θρεπτικού υλικού (αφομοίωσε 41,5 g/L), σε μια καλλιέργεια διάρκειας 91,5 ωρών. Η βιομάζα ανήλθε στα 12,1 g/L και το λίπος ήταν μόλις 0,8 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_S^X=0,30 \frac{g \text{ βιομάζας}}{g \text{ υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_S^P=0,02 \frac{g \text{ προϊόντος}}{g \text{ υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,1 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,008 g/L/h. Η περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{X^P}^P$ , ισούται με  $0,10 \frac{g \text{ λίπους}}{g \text{ βιομάζας}}$ . Η τιμή του pH μειώθηκε 2 φορές κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και ρυθμίστηκε με NaOH 5M.

### 4.1.3. Καλλιέργεια του *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536



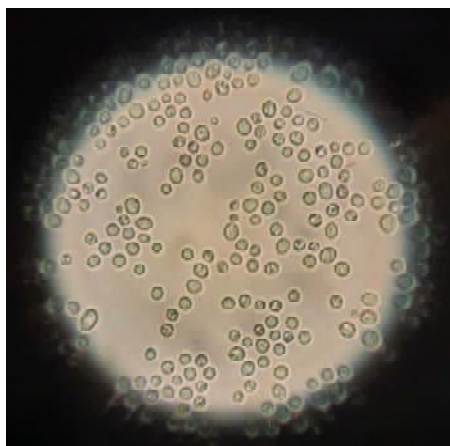
**Εικόνα 55.** Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x40) (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).



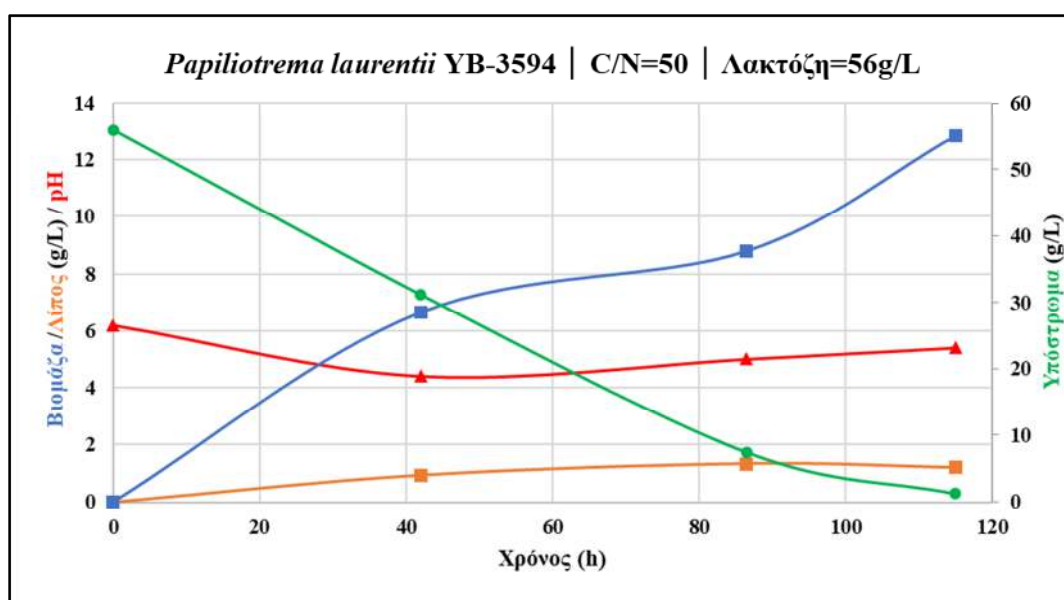
**Εικόνα 56.** Κινητική ανάπτυξης του *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.

Η καλλιέργεια των 92 ωρών, του μικροοργανισμού *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536 (Εικόνα 54), οδήγησε σε αφομοίωση 40,5 g/L λακτόζης, παράγοντας 13,2 g/L βιομάζα και λίπος 1,5 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_{S}^X=0,33 \frac{\text{g βιομάζας}}{\text{g υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S}^P=0,04 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,14 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,02 g/L/h. Η περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{X/P}^P$ , ισούται με  $0,11 \frac{\text{g λίπους}}{\text{g βιομάζας}}$ . Η τιμή του pH μειώθηκε 2 φορές κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και ρυθμίστηκε με NaOH 5M (Εικόνα 55).

#### 4.1.4. Καλλιέργεια του *Papiliotrema laurentii* NRRL YB-3594



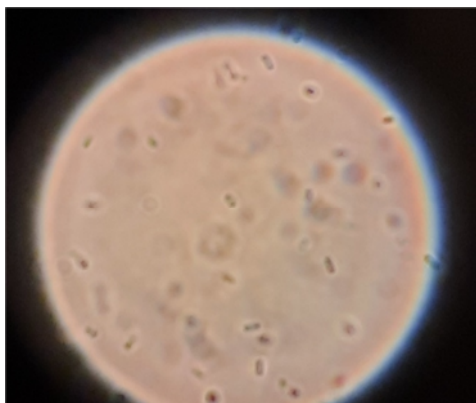
**Εικόνα 57.** Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης *Papiliotrema laurentii* NRRL YB-3594 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x40) (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).



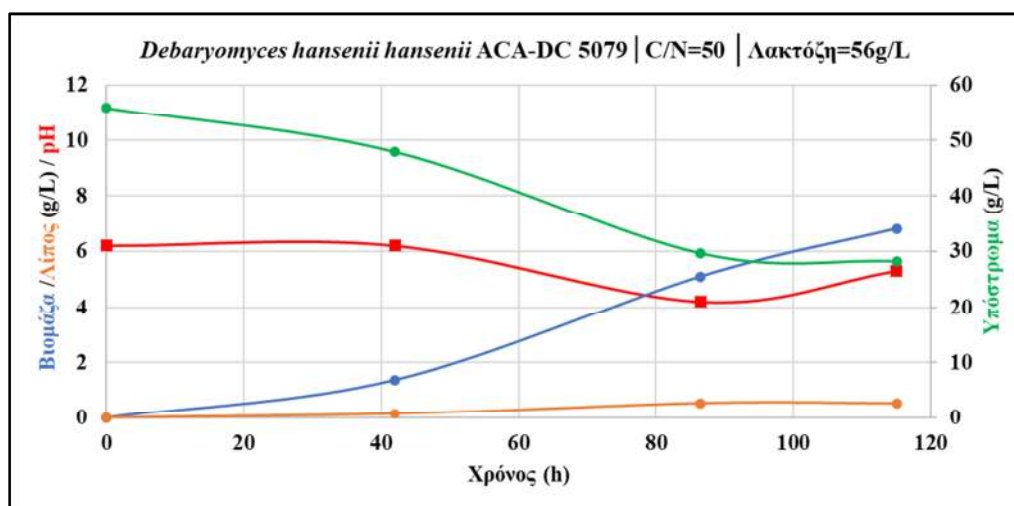
**Εικόνα 58.** Κινητική ανάπτυξης του *Papiliotrema laurentii* YB-3594 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.

Ο μικροοργανισμός *Papiliotrema laurentii* NRRL YB-3594 (Εικόνα 56), σε καλλιέργεια 115 ωρών, αφομοίωσε σε σχεδόν πλήρως τη λακτόζη (54,7 g/L), παράγοντας 12,9 g/L βιομάζα και περί το 1,2 g/L λίπος. Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_{S}^X=0,24 \frac{g \text{ βιομάζας}}{g \text{ υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S}^P=0,02 \frac{g \text{ προϊόντος}}{g \text{ υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,11 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,010 g/L/h. Η περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{X}^P$ , ισούται με  $0,09 \frac{g \text{ λίπους}}{g \text{ βιομάζας}}$ . Η τιμή του pH μειώθηκε 2 φορές κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και ρυθμίστηκε με NaOH 5M (Εικόνα 57).

#### 4.1.5. Καλλιέργεια του *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079



Εικόνα 59. Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100) (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).



Εικόνα 60. Κινητική ανάπτυξης του *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.

Στην γράφημα της Εικόνας 59 απεικονίζεται η κινητική του μικροοργανισμού *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079 (Εικόνα 58) και παρατηρείται πως σε αυτή την περίπτωση δεν καταναλώθηκε η πηγή άνθρακα, παρά μόνο 27,8 g/L, σε διάρκεια 115 ωρών. Η παραγόμενη βιομάζα ανήλθε στα 6,8 g/L, με το λίπος να είναι περί τα 0,6 g/L, οπότε η περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{X/P}^P$ , ισούτο με  $0,09 \frac{\text{g λίπους}}{\text{g βιομάζας}}$ . Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_{S/X}^X=0,25 \frac{\text{g βιομάζας}}{\text{g υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S/P}^P=0,02 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,06 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,005 g/L/h. Η τιμή του pH μειώθηκε 1 φορά κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και ρυθμίστηκε με NaOH 5M.

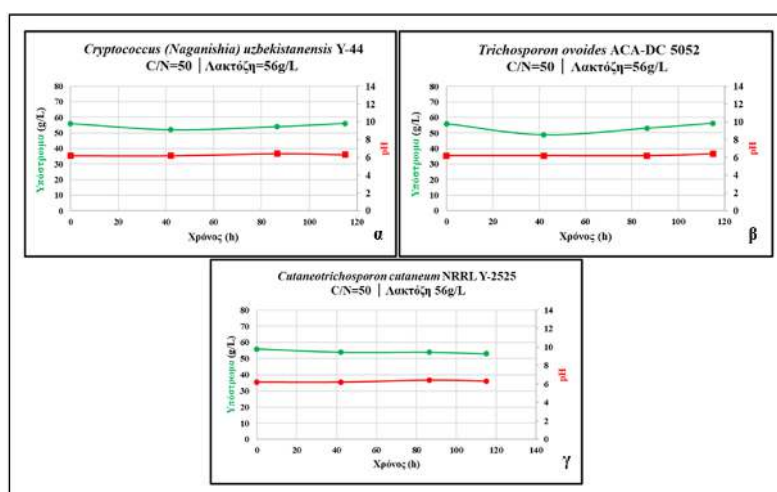


#### 4.1.6. Καλλιέργεια των *Cryptococcus (Naganishia) uzbekistanensis* NRRL Y-44, *Trichosporon ovoides* ACA-DC 5052 και *Cutaneotrichosporon cutaneum* NRRL Y-2525

Οι μικροοργανισμοί *Cryptococcus (Naganishia) uzbekistanensis* NRRL Y-44, *Trichosporon ovoides* ACA-DC 5052 και *Cutaneotrichosporon cutaneum* NRRL Y-2525 (Εικόνα 60), όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, καλλιεργήθηκαν σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λόγο C/N=50 και περιεκτικότητα σε λακτόζη 56 g/L. Οι πηγές αζώτου, εκχύλισμα ζύμης και θειικό αμμώνιο, ρυθμίστηκαν στα 2,32 g/L και 1,09 g/L, αντίστοιχα. Σε αντίθεση, όμως, με τους προηγούμενους, οι 3 αυτοί μικροοργανισμοί δεν αναπτύχθηκαν στο ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα, με πηγή άνθρακα τη λακτόζη, η οποία δεν καταναλώθηκε, όπως φανερώνουν τα γραφήματα παρακάτω (Εικόνα 61). Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, δεν παρατηρήθηκε απότομη αύξηση ή μείωση του pH, που θα δικαιολογούσε πιθανό θάνατο των κυττάρων.



**Εικόνα 61.** Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζύμης α) *Cryptococcus (Naganishia) uzbekistanensis* NRRL Y-44 (μεγέθυνσης x40), β) *Cutaneotrichosporon cutaneum* NRRL Y-2525 (μεγέθυνσης x100) και γ) *Trichosporon ovoides* ACA-DC 5052 (μεγέθυνσης x40) σε οπτικό μικροσκόπιο (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).



**Εικόνα 62.** Κινητική ανάπτυξης των α) *Cryptococcus (Naganishia) uzbekistanensis* NRRL Y-44, β) *Trichosporon ovoides* ACA-DC 5052 και γ) *Cutaneotrichosporon cutaneum* NRRL Y-2525 σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λακτόζη 56 g/L.

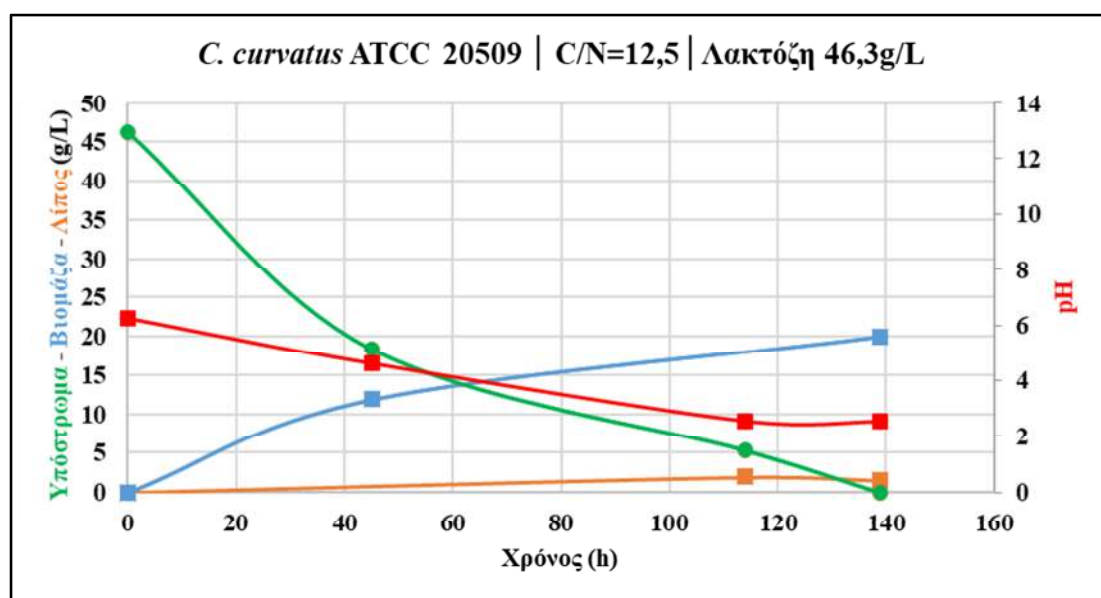


#### 4.1.6. Επανακαλλιέργεια του *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509

Ο μικροοργανισμός *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, λόγω της υψηλής παραγωγής λιπιδίων και της επακόλουθης υψηλής λιποπεριεκτικότητας επί ξηρής βιομάζας, σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, καλλιεργήθηκε σε νέα υποστρώματα τόσο με περίσσεια, όσο και με πενία αζώτου.

##### ▪ Περίσσεια αζώτου

Ο μικροοργανισμός *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη λακτόζη (46,3 g/L) και πηγές αζώτου εκχύλισμα ζύμης (5 g/L) και θειικό αμμώνιο (5 g/L). Ο λόγος C/N ισούται με  $12,5 \frac{g\ C}{g\ N}$ . Τα υπόλοιπα μεταλλικά στοιχεία του θρεπτικού μέσου αναγράφονται στον πίνακα 10.



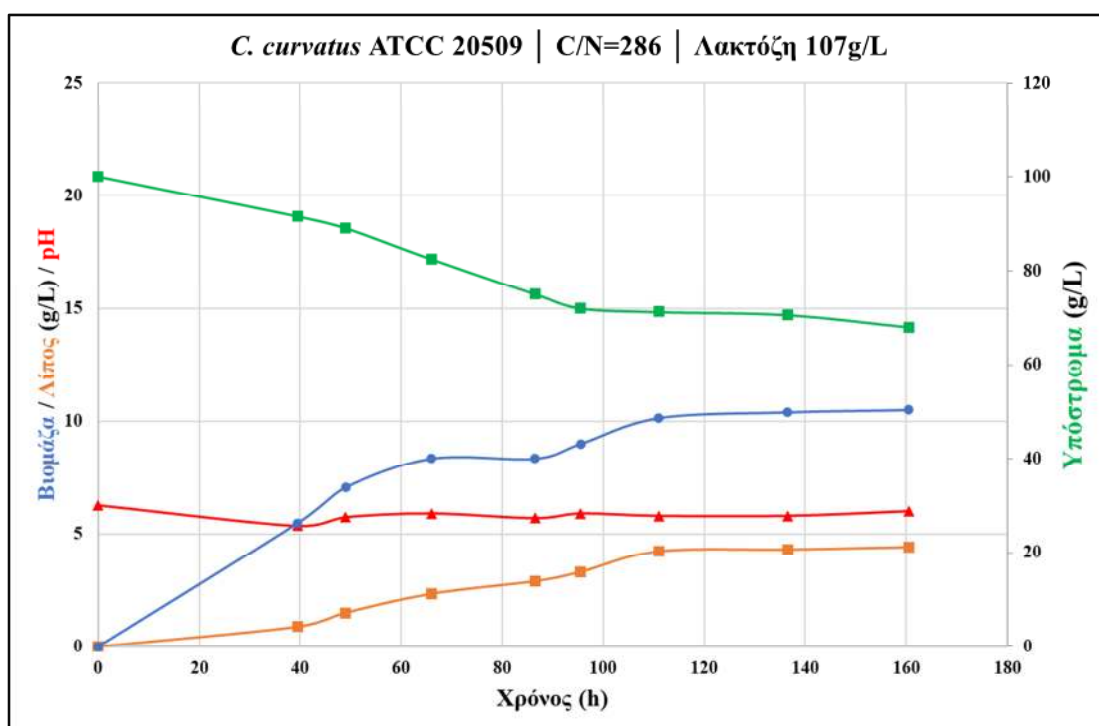
Εικόνα 63. Κινητική ανάπτυξης του *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περίσσεια αζώτου.

Σύμφωνα με το γράφημα (Εικόνα 62), η καλλιέργεια τερματίστηκε στις 139 ώρες, με την πηγή άνθρακα να έχει καταναλωθεί πλήρως, το βάρος της ξηρής βιομάζας να πλησιάζει στα 20 g/L και το λίπος τα 1,52 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα,  $Y_{S}^X$ , ισούται με  $0,43 \frac{g\ βιομάζας}{g\ υποστρώματος}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S}^P$ , ισούται με  $0,03 \frac{g\ προϊόντος}{g\ υποστρώματος}$ . Η παραγωγικότητα, δηλαδή η ποσότητα που παράγεται στη μονάδα του χρόνου, για την περίπτωση της ξηρής βιομάζας ήταν 0,14 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,011 g/L/h. Η περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας

σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{X}^P$ , ισούται με  $0,08 \frac{g \text{ λίπους}}{g \text{ βιομάζας}}$ . Η τιμή του pH=2,5 μειώθηκε σε χαμηλά επίπεδα, λόγω της διάστασης του θεικού αμμωνίου και απελευθέρωσης θεικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), επίπεδα απαγορευτικά για την ανάπτυξή του.

#### ▪ Πενία αζώτου

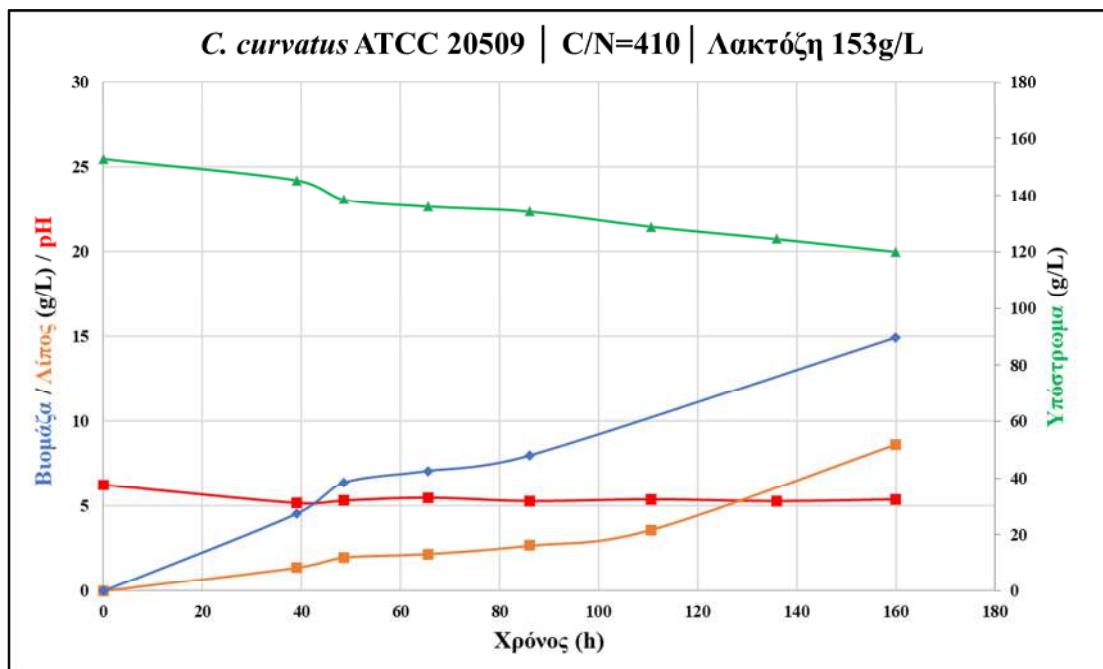
Στις επόμενες 2 πειραματικές διατάξεις, ο μικροοργανισμός *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη λακτόζη (107 g/L και 153 g/L) και πηγές αζώτου εκχύλισμα ζύμης (0,5 g/L) και θεικό αμμώνιο (0,5 g/L). Ο λόγος C/N ισούται με  $286 \frac{g \text{ C}}{g \text{ N}}$  και  $410 \frac{g \text{ C}}{g \text{ N}}$ , αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα μεταλλικά στοιχεία του θρεπτικού μέσου αναγράφονται στον πίνακα 10.



**Εικόνα 64.** Κινητική ανάπτυξης του *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 σε θρεπτικό υπόστρωμα με πενία αζώτου και λακτόζη 107 g/L.

Σύμφωνα με το γράφημα (Εικόνα 63), στην καλλιέργεια 111 ωρών, η πηγή άνθρακα καταναλώνεται μερικώς (αφομοίωση 39 g/L), η βιομάζα ισούται με 10,5 g/L και το λίπος τα 4,4 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_{S}^X = 0,27 \frac{g \text{ βιομάζας}}{g \text{ υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S}^P = 0,11 \frac{g \text{ προϊόντος}}{g \text{ υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,10 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,04 g/L/h. Η

περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{\chi}^P$ , ισούται με  $0,42 \frac{g \text{ λίπους}}{g \text{ βιομάζας}}$ . Η τιμή του pH παρέμεινε σταθερή, σε τιμή περί το 5,4, pH που ευνοεί την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.



Εικόνα 65. Κινητική ανάπτυξης του *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 σε θρεπτικό υπόστρωμα με πενία αζώτου και λακτόζη 153 g/L.

Στο γράφημα της Εικόνας 64 παρατηρείται πως ούτε σε αυτή την περίπτωση καταναλώθηκε η πηγή άνθρακα, παρά μόνο 33 g/L, σε διάρκεια 160 ωρών. Η βιομάζα ανήλθε στα 15 g/L και το λίπος στα 9 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_{S}^X = 0,46 \frac{g \text{ βιομάζας}}{g \text{ υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S}^P = 0,27 \frac{g \text{ προϊόντος}}{g \text{ υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,1 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,06 g/L/h. Η περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{\chi}^P$ , ισούται με  $0,60 \frac{g \text{ λίπους}}{g \text{ βιομάζας}}$ . Η τιμή του pH παρέμεινε σταθερή, σε τιμή περί το 5,4, pH, που ευνοεί την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

## 4.2. Καλλιέργεια σε δευτερογενές τυρόγαλα |

Από την καλλιέργεια των 8 στελεχών σε ορισμένο θρεπτικό μέσο, εδείχθη ότι τα 5 εξ' αυτών έχουν τη δυνατότητα αφομοίωσης της λακτόζης, οπότε καλλιεργήθηκαν, επακόλουθα, σε δευτερογενές τυρόγαλα, το οποίο υπέστη φυγοκέντρηση και διήθηση. Όπως αναγράφεται στον Πίνακα 12, η συγκέντρωση της λακτόζης είναι 59 g/L, το pH=6,25, η προσδιοριζόμενη, με τη μέθοδο Bradford, πρωτεΐνη ισούτο με 1,07 g/L και το προσδιοριζόμενο, μέσω της φωτομετρικής μεθόδου της νινυδρίνης, άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων ισούτο με 64 mg/L. Στις πειραματικές αυτές διατάξεις προσδιορίστηκε η μη-καταναλωθείσα λακτόζη, το ολικό ξηρό βάρος της βιομάζας (Total Dry Weight, T.D.W.), το παραχθέν λίπος, το pH, ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα,  $Y_X^X$ , ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_S^P$ , η παραγωγικότητα της ξηρής βιομάζας,  $P_X$ , η παραγωγικότητα του προϊόντος,  $P_L$ , η περιεκτικότητα της ξηρής βιομάζας σε λίπος,  $K_{X}^P$ , η συγκέντρωση πρωτεΐνης και η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων. Τα αποτελέσματα καταγράφονται, συγκεντρωτικά, στον ακόλουθο Πίνακα 14 και αναλύονται, ξεχωριστά, στη συνέχεια.

**Πίνακας 14.** Καταγραφή των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας των 5 ελαιογόνων ζυμών σε σύνθετο θρεπτικό υπόστρωμα, το φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.

Strain	Time	pH	Consumed Substrate	TDW	Lipids	YX/S	YP/S	KP/X	PX	PL
	(h)		Scon (g/L)							
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	100,5	7,0	59,0	22,7	3,4	0,40	0,120	0,15	0,23	0,040
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	170	6,0	42,9	16,9	2,3	0,40	0,050	0,13	0,10	0,013
<i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL Y-2536	100,5	5,0	49,0	20,4	1,1	0,40	0,024	0,06	0,20	0,011
<i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL YB-3594	100,5	6,4	55,7	14,7	0,9	0,27	0,017	0,06	0,15	0,010
<i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> ACA-DC 5079	170	6,5	18,1	8,3	1,2	0,40	0,020	0,15	0,05	0,007

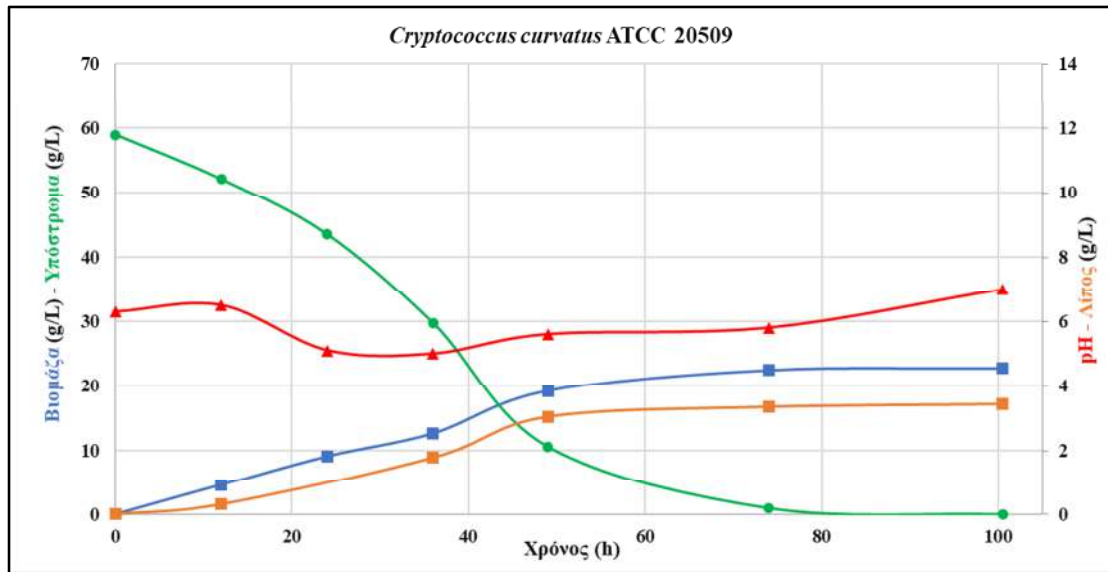
#### 4.2.1. Καλλιέργεια του *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509

Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 σε δευτερογενές τυρόγαλα τερματίστηκε στις 100,5 ώρες, με τη λακτόζη να αφομοιώνεται πλήρως. Η παραχθείσα ξηρή βιομάζα ανήλθε στα 22,7 g/L και το ενδοκυτταρικό λίπος στα 3,4 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_{S/X}^X=0,40 \frac{\text{g βιομάζας}}{\text{g υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S/P}^P=0,12 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,23 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,04 g/L/h. Η περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{X/P}^P$ , ισούται με  $0,15 \frac{\text{g λίπους}}{\text{g βιομάζας}}$ . Η τιμή του pH μειώθηκε 1 φορά και αυξήθηκε 1 φορά, πέραν των επιτρεπτών ορίων, κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και ρυθμίστηκε με NaOH 5M και HCl 5M (Εικόνα 65). Η συγκέντρωση πρωτεΐνης και η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων υφίσταντο αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Παρατηρώντας τα 2 γραφήματα γίνεται αντιληπτό ότι η λιποσυσσώρευση εκκινεί όταν η συγκέντρωση των F.A.N. σταθεροποιείται και όταν αυτή αυξάνεται πάλι, λόγω πρωτεόλυσης, όπως φανερώνει η μειούμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης στις 74 ώρες, η συγκέντρωση του λίπους παραμένει σταθερή (Εικόνα 66).

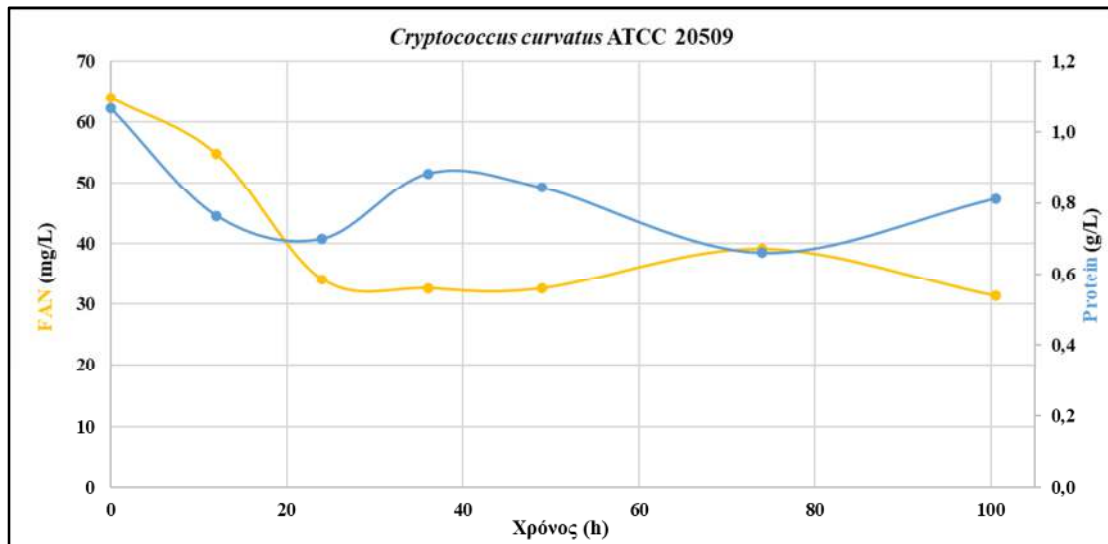
Με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας εδείχθη ότι το λίπος, ενδοκυτταρικά απαντάται με μορφή κυρίως τριακυλογλυκερολών, με στερόλες και λίγα ελεύθερα λιπαρά οξέα (Εικόνα 77). Με την αέρια χρωματογραφία προσδιορίστηκε ότι τα λιπαρά οξέα, που δομούν τα λιπίδια αυτά, είναι κυρίως το ελαϊκό οξύ, C18:1 (52,8%), τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (Saturated Fatty Acid – S.F.A.) παλμιτικό οξύ, C16:0 (29,3%) και το στεατικό οξύ C18:0 (10,3%), με τα ακόρεστα (Unsaturated Fatty Acid – U.F.A.) να είναι η πλειονότητα (59,9%) (Πίνακας 15).

**Πίνακας 15.** Καταγραφή της περιεκτικότητας των λιπιδίων στα κάτωθι ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Ελεύθερα Λιπαρά οξέα	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	S.F.A.	U.F.A.	M.U.F.A.	P.U.F.A.
Περιεκτικότητα (%)	0,5	0,2	29,3	1,2	10,3	52,8	5,7	40,1	59,9	54,2	5,7



**Εικόνα 66.** Κινητική ανάπτυξης του *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.



**Εικόνα 67.** Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων κατά την καλλιέργεια του *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.



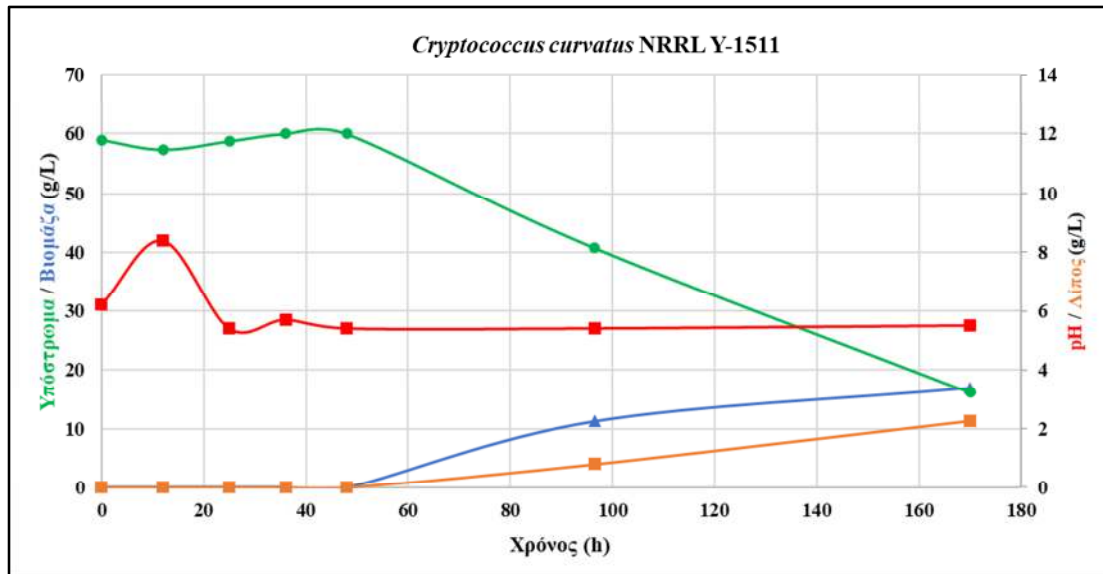
#### 4.2.2. Καλλιέργεια του *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511

Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 σε δευτερογενές τυρόγαλα τερματίστηκε στις 170 ώρες, καθώς τις πρώτες 48 ώρες δεν παρατηρήθηκε καμία αφομοίωση υποστρώματος και παραγωγή μικροβιακών κυττάρων, ενώ μεσολάβησε και μια αύξηση του pH στην τιμή 8, μόλις στις 12 ώρες. Η λακτόζη που αφομοιώθηκε ισούτο με 42,9 g/L, με την τελικώς παραχθείσα ξηρή βιομάζα να ανέρχεται στα 16,9 g/L και το ενδοκυτταρικό λίπος στα 2,3 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_{S}^X = 0,40 \frac{\text{g βιομάζας}}{\text{g υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S}^P = 0,05 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,1 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,013 g/L/h. Η περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{X}^P$ , ισούται με  $0,13 \frac{\text{g λίπους}}{\text{g βιομάζας}}$ . Η τιμή του pH αυξήθηκε 1 φορά κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, όπως προαναφέρθηκε και ρυθμίστηκε με HCl 5M (Εικόνα 67). Η συγκέντρωση πρωτεΐνης μειώθηκε και σταθεροποιήθηκε, ενώ η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, αρχικώς γνώρισε ραγδαία αύξηση, ύστερα μειώθηκε και σταθεροποιήθηκε, όπως και η συγκέντρωση πρωτεΐνης, κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Παρατηρώντας τα 2 γραφήματα γίνεται αντιληπτό ότι η λιποσυσσώρευση εκκινεί όταν οι συγκεντρώσεις των F.A.N. και της πρωτεΐνης μειώνονται και σταθεροποιούνται (Εικόνα 68).

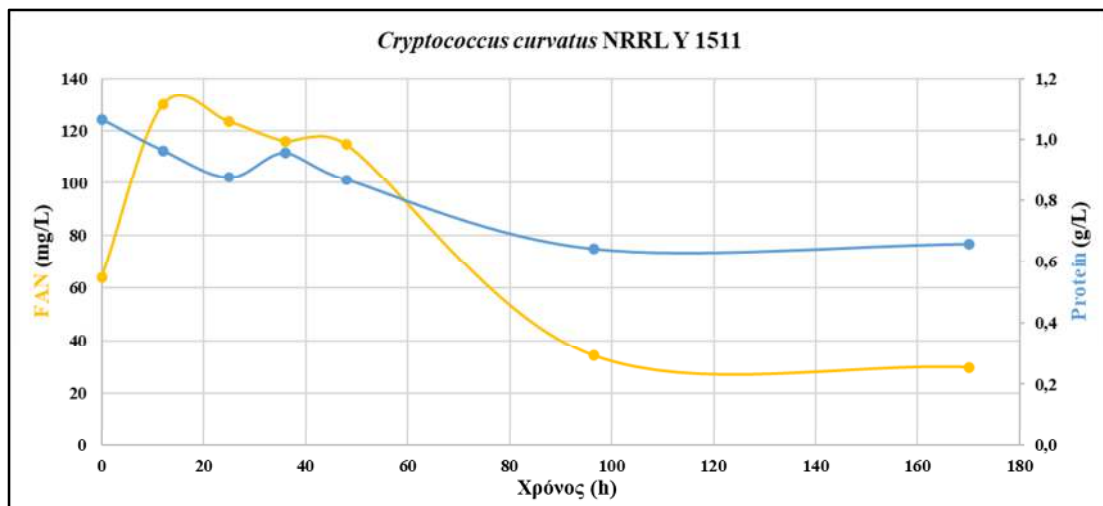
Με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας εδείχθη ότι το λίπος, ενδοκυτταρικά, ακολουθεί το ίδιο προφίλ, όπως προηγουμένως, με τριακυλογλυκερόλες, στερόλες και ελεύθερα λιπαρά οξέα (Εικόνα 77). Με την αέρια χρωματογραφία προσδιορίστηκε ότι τα λιπαρά οξέα, που δομούν τα λιπίδια αυτά, είναι κυρίως το ελαϊκό οξύ, C18:1 (47,3%), το παλμιτικό οξύ, C16:0 (26,3%) και το στεατικό οξύ C18:0 (14,9%). Η πλειονότητα των λιπαρών οξέων ήταν ακόρεστα (58%) (μονοακόρεστα, M.U.F.A. & πολυακόρεστα, P.U.F.A.), με το υπόλοιπο 42% να αφορά κορεσμένα λιπαρά οξέα (Πίνακας 16).

**Πίνακας 16.** Καταγραφή της περιεκτικότητας των λιπιδίων στα κάτωθι ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Ελεύθερα Λιπαρά οξέα	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	S.F.A.	U.F.A.	M.U.F.A.	P.U.F.A.
Περιεκτικότητα (%)	0,8	1,2	26,3	0,2	14,9	47,3	9,3	42,0	58,0	48,7	9,3



**Εικόνα 68.** Κινητική ανάπτυξης του *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.



**Εικόνα 69.** Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων κατά την καλλιέργεια του *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.

### 4.2.3. Καλλιέργεια του *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536

Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536 σε δευτερογενές τυρόγαλα τερματίστηκε στις 100,5 ώρες, με τη λακτόζη να αφομοιώνεται σχεδόν πλήρως (49 g/L). Η παραχθείσα ξηρή βιομάζα ανήλθε στα 20,4 g/L και το ενδοκυτταρικό λίπος στα 1,1 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_{S}^X = 0,40 \frac{\text{g βιομάζας}}{\text{g υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S}^P = 0,024 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,20 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,011 g/L/h. Η περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{X}^P$ , ισούται με  $0,06 \frac{\text{g λίπους}}{\text{g βιομάζας}}$ . Η τιμή του pH διατηρήθηκε σταθερή, σε επιθυμητά επίπεδα, καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας (Εικόνα 70).

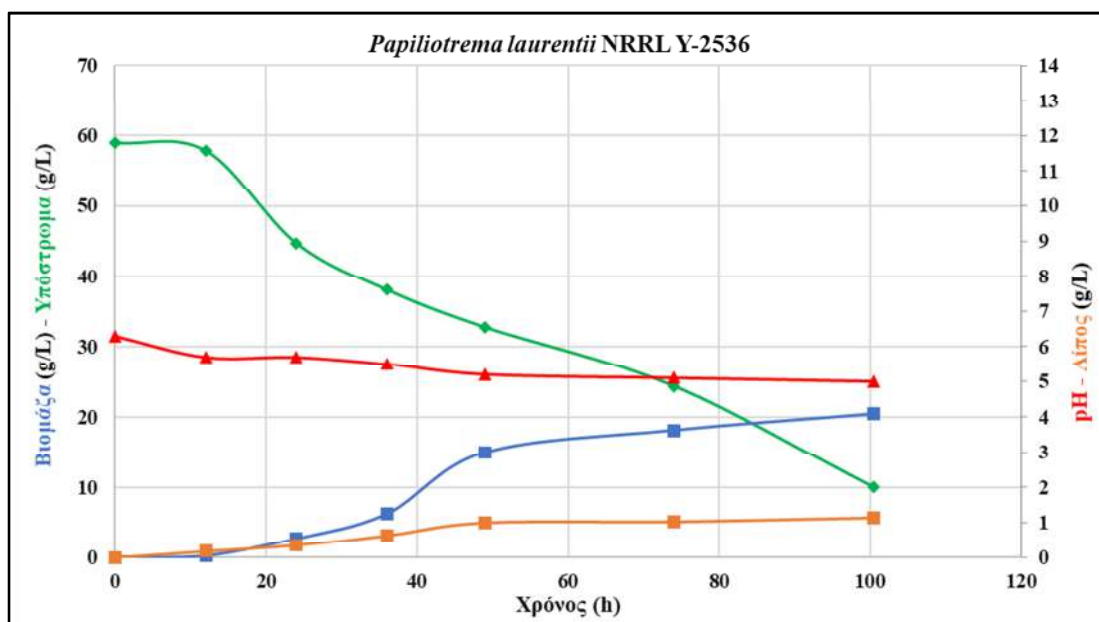
Η δυσκολία στο διαχωρισμό υπερκειμένου και βιομάζας, λόγω πολύ υψηλού ιξώδους, άρθηκε μέσω προσθήκης ακετόνης (99% v/v). Η ακετόνη οδήγησε, αρχικά σε νεφέλωμα, κι ύστερα στην κατακρήμνιση των πολυσακχαριτών και το διαχωρισμό τους από το υγρό της καλλιέργειας, αποδίδοντας ένα παχύρευστο, ελαστικό ίζημα (Εικόνα 69).



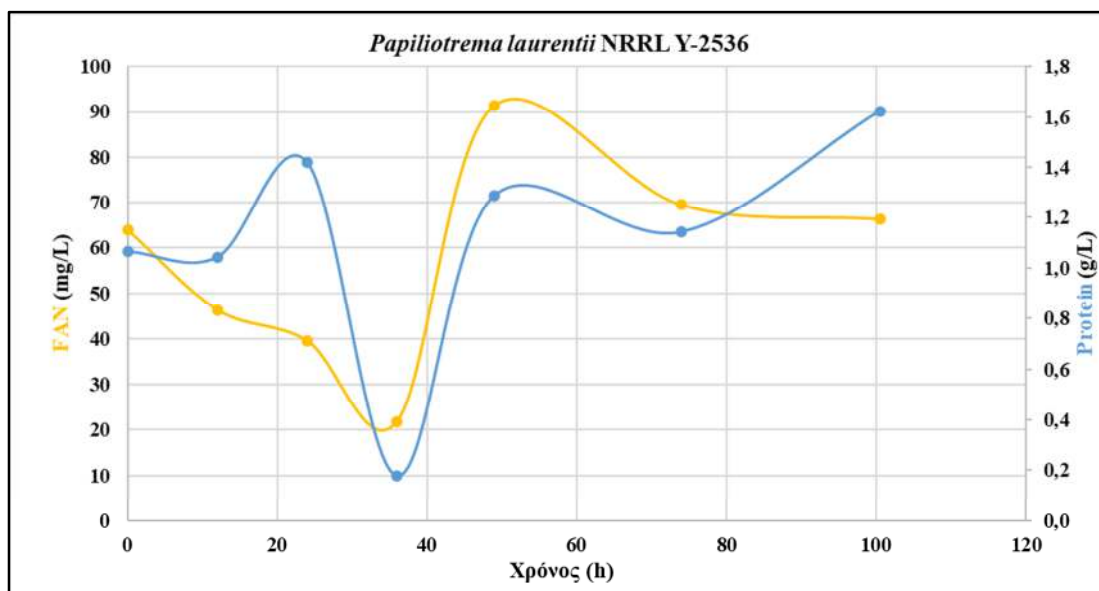
**Εικόνα 70.** Το υψηλό ιξώδες της καλλιέργειας του *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536 (α), ύστερα από την προσθήκη ακετόνης σχηματίζει νεφέλωμα (β), το οποίο κατακρημνίζεται (γ), αποδίδοντας ένα παχύρευστο, ελαστικό ίζημα (δ) (Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.).

Η συγκέντρωση πρωτεΐνης, αρχικά αυξήθηκε και γνώρισε απότομη πτώση, όπως ανάλογη πτώση γνώρισε και η F.A.N.. Στο χρονικό αυτό σημείο, αυξήθηκε η βιομάζα των κυττάρων. Η μείωση των 2 παραγόντων, οδήγησε στην παραγωγή

ενδοκυτταρικού λίπους. Όταν η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων και της πρωτεΐνης αυξήθηκε ξανά και σταθεροποιήθηκε, μειώθηκε ο ρυθμός παραγωγής βιομάζας και σταθεροποιήθηκε η ποσότητα των ενδοκυτταρικών λιπιδίων. (Εικόνα 71).



**Εικόνα 71.** Κινητική ανάπτυξης του *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.



**Εικόνα 72.** Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων κατά την καλλιέργεια του *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.

Με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας εδείχθη ότι το λίπος, ενδοκυτταρικά, εμπεριέχει λιγότερες τριάκυλογλυκερόλες και στερόλες, σε σύγκριση με τα

προηγούμενα 2 στελέχη, ενώ τα ελεύθερα λιπαρά οξέα εμφανίζονται 2 σημεία της στήλης, σε αντίθεση με τις προηγούμενες περιπτώσεις που ήταν σε 1 σημείο (Εικόνα 77). Με την αέρια χρωματογραφία προσδιορίστηκε ότι τα λιπαρά οξέα, που δομούν τα λιπίδια αυτά, είναι κυρίως το ελαϊκό οξύ, C18:1 (46,1%), το παλμιτικό οξύ, C16:0 (28,2%) και το στεατικό οξύ C18:0 (14,7%). Η πλειονότητα των λιπαρών οξέων ήταν ακόρεστα (53,5%), με το υπόλοιπο 46,5% να είναι κορεσμένα λιπαρά οξέα (Πίνακας 17).

**Πίνακας 17.** Καταγραφή της περιεκτικότητας των λιπιδίων στα κάτωθι ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Ελεύθερα Λιπαρά οξέα	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	S.F.A.	U.F.A.	M.U.F.A.	P.U.F.A.
Περιεκτικότητα (%)	3,6	2,5	28,2	0,6	14,7	46,1	4,3	46,5	53,5	49,2	4,3

#### 4.2.4. Καλλιέργεια του *Papiliotrema laurentii* NRRL YB-3594

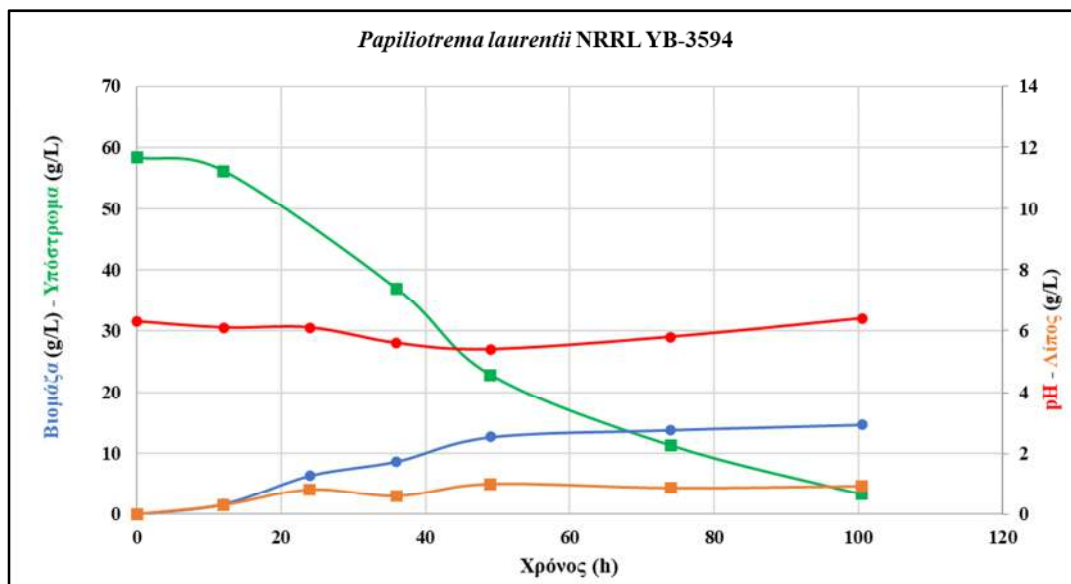
Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Papiliotrema laurentii* NRRL YB-3594 σε δευτερογενές τυρόγαλα τερματίστηκε στις 100,5 ώρες, με τη λακτόζη να αφομοιώνεται σχεδόν πλήρως (55,7 g/L). Η παραχθείσα ξηρή βιομάζα ανήλθε στα 14,7 g/L και το ενδοκυτταρικό λίπος στο 0,9 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_{S}^X = 0,27 \frac{\text{g βιομάζας}}{\text{g υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S}^P = 0,017 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,15 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,01 g/L/h. Η περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{X}^P$ , ισούται με  $0,06 \frac{\text{g λίπους}}{\text{g βιομάζας}}$ . Η τιμή του pH διατηρήθηκε σταθερή, σε επιθυμητά επίπεδα, καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας (Εικόνα 72). Η συγκέντρωση πρωτεΐνης και η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων μειώθηκαν τις πρώτες 24 ώρες, λόγω αύξησης της κυτταροπλασσίας. Στα χαμηλά επίπεδα αυτών εκκίνησε η λιποσυσσώρευση, αλλά όταν αυξήθηκαν πάλι και παρέμειναν σταθερές οι 2 αυτές παράμετροι, μειώθηκε ο ρυθμός παραγωγής βιομάζας και σταθεροποιήθηκε η ποσότητα του λίπους (Εικόνα 73).

Για το λίπος από το στέλεχος αυτό, η στήλη έδειξε ότι το προφίλ είναι ίδιο με του προηγούμενου στελέχους του ίδιου είδους, με τα σημεία όμως να είναι πιο έντονα (Εικόνα 77). Με την αέρια χρωματογραφία προσδιορίστηκε ότι τα λιπαρά οξέα, που δομούν τα λιπίδια αυτά, είναι κυρίως το ελαϊκό οξύ, C18:1 (56,4%), το παλμιτικό οξύ, C16:0 (19,1%) και το στεατικό οξύ C18:0 (14,4%). Η πλειονότητα των λιπαρών

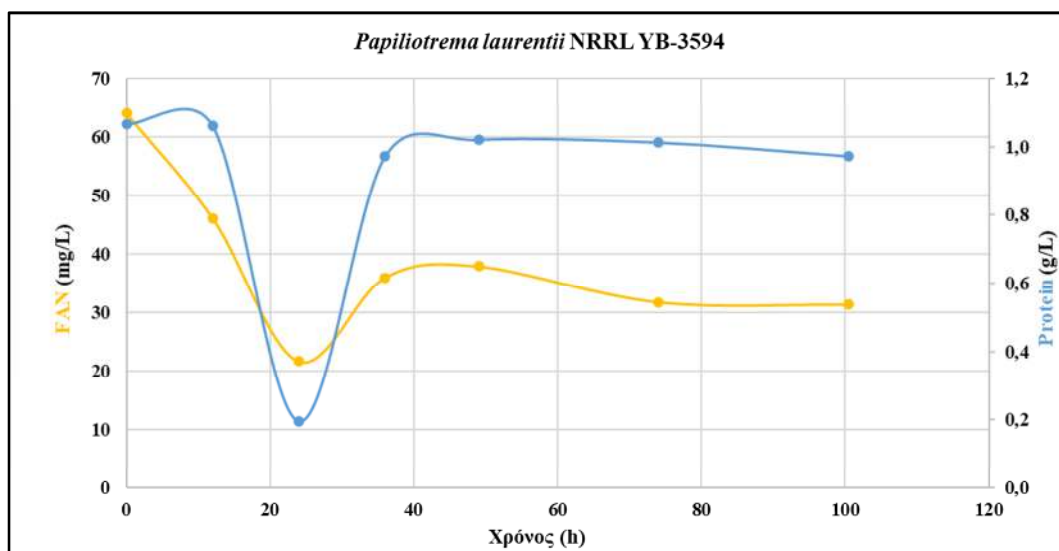
οξέων ήταν ακόρεστα (65,5%), με το υπόλοιπο 34,5% να αφορά κορεσμένα λιπαρά οξέα (Πίνακας 18).

**Πίνακας 18.** Καταγραφή της περιεκτικότητας των λιπιδίων στα κάτωθι ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Ελεύθερα Λιπαρά οξέα	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	S.F.A.	U.F.A.	M.U.F.A.	P.U.F.A.
Περιεκτικότητα (%)	0,9	0,5	19,1	0,3	14,4	56,4	8,3	34,5	65,5	57,2	8,3



**Εικόνα 73.** Κινητική ανάπτυξης του *Papiliotrema laurentii* NRRL YB-3594 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.



**Εικόνα 74.** Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων κατά την καλλιέργεια του *Papiliotrema laurentii* NRRL YB-3594 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.



#### 4.2.5. Καλλιέργεια του *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079

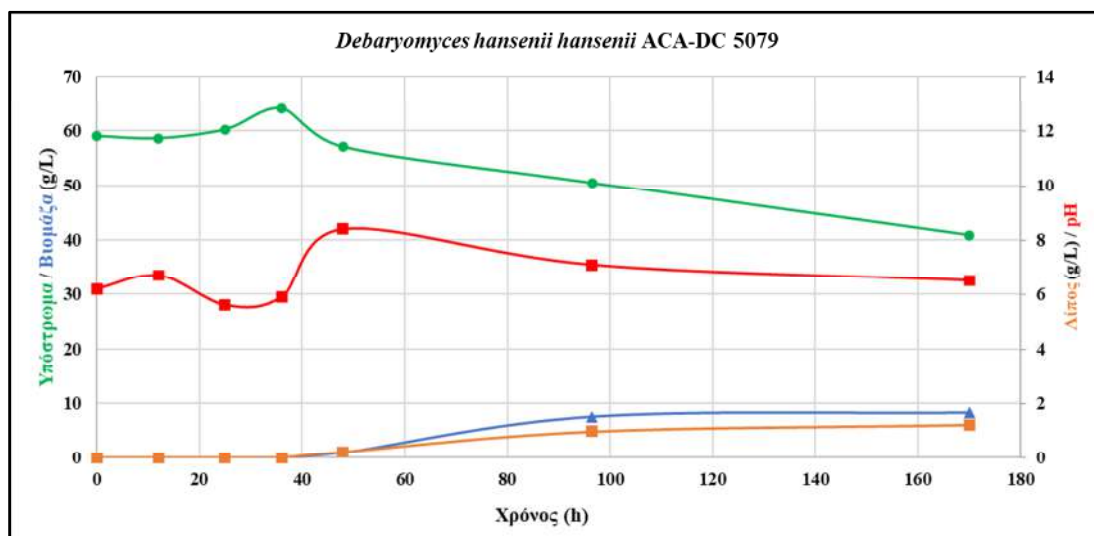
Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079 σε δευτερογενές τυρόγαλα, όπως και αυτή του *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511, τερματίστηκε στις 170 ώρες, καθώς τις πρώτες 48 ώρες δεν παρατηρήθηκε καμία αφομοίωση υποστρώματος και παραγωγή μικροβιακών κυττάρων, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση του pH στην τιμή 8,4, στις 48 ώρες. Η λακτόζη που αφομοιώθηκε ισούτο με 18,1 g/L, με την τελικώς παραχθείσα ξηρή βιομάζα να ανέρχεται στα 8,3g/L και το ενδοκυτταρικό λίπος στα 1,2 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης  $Y_{S}^X = 0,40 \frac{\text{g βιομάζας}}{\text{g υποστρώματος}}$ , ενώ ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν,  $Y_{S}^P = 0,02 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστρώματος}}$ . Η παραγωγικότητα βιομάζας ήταν 0,05 g/L/h και για το λίπος ήταν 0,007 g/L/h. Η περιεκτικότητα της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $K_{X}^P$ , ισούται με  $0,15 \frac{\text{g λίπους}}{\text{g βιομάζας}}$ . Η τιμή του pH αυξήθηκε 1 φορά κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, όπως προαναφέρθηκε και ρυθμίστηκε με HCl 5M (Εικόνα 74). Η συγκέντρωση πρωτεΐνης διατηρήθηκε σταθερή έως τις 48 ώρες και ύστερα μειώθηκε, με τη συγκέντρωση F.A.N. να διατηρείται σταθερή και ύστερα να αυξάνεται και οι 2 έως τις 96,5 ώρες, όπου παρατηρήθηκε παράλληλη αύξηση της βιομάζας και της λιποπεριεκτικότητας. Μετά τη χρονική εκείνη στιγμή τόσο η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και της F.A.N., όσο και η τιμή της βιομάζας και του λίπους, παρέμειναν σχεδόν σταθερές (Εικόνα 75). Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες καλλιέργειες, των οποίων το χρώμα ήταν λευκό-υποκίτρινο, στη συγκεκριμένη το χρώμα πλησίαζε την πορτοκαλί απόχρωση. Επιπροσθέτως, ενώ το λίπος ύστερα από την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, Folsch, στις υπόλοιπες περιπτώσεις ήταν σε υγρή μορφή, σε αυτή ήταν κίτρινο και στερεό (Εικόνα 76).

Με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας εδείχθη ότι το λίπος, ενδοκυτταρικά, απαντάται, κυρίως, υπό μορφή ελεύθερων λιπαρών οξέων (3 σημεία στη στήλη), με ελάχιστα τριγλυκερίδια και στερόλες (Εικόνα 77). Με την αέρια χρωματογραφία προσδιορίστηκε ότι τα λιπαρά οξέα, που δομούν τα λιπίδια αυτά, είναι κυρίως το ελαϊκό οξύ, C18:1 (44,8%), το παλμιτικό οξύ, C16:0 (26,3%) και το στεατικό οξύ C18:0 (6,2%). Σε υψηλά επίπεδα ήταν και η τιμή του παλμιτελαϊκού οξέος C16:1 (12%), σε αντίθεση με τις προηγούμενες περιπτώσεις. Τα λιπαρών οξέων ήταν

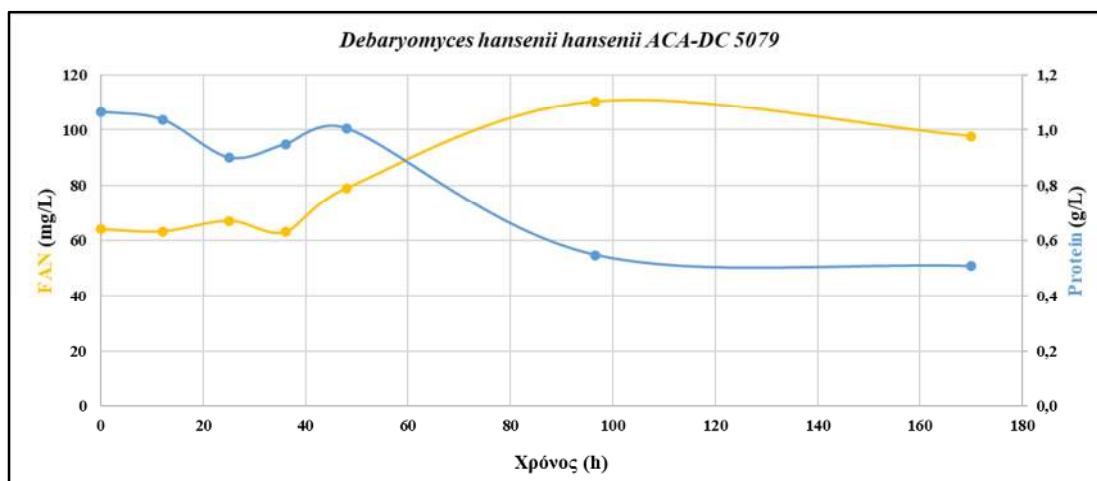
κορεσμένα (54,2%), με το υπόλοιπο 45,8% να αφορά ακόρεστα λιπαρά οξέα (Πίνακας 19).

**Πίνακας 19.** Καταγραφή της περιεκτικότητας των λιπιδίων στα κάτωθι ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Ελεύθερα Λιπαρά οξέα	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	S.F.A.	U.F.A.	M.U.F.A.	P.U.F.A.
Περιεκτικότητα (%)	5,1	3,7	26,3	12,0	6,2	44,8	1,9	37,7	62,3	60,4	1,9



**Εικόνα 75.** Κινητική ανάπτυξης του *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.



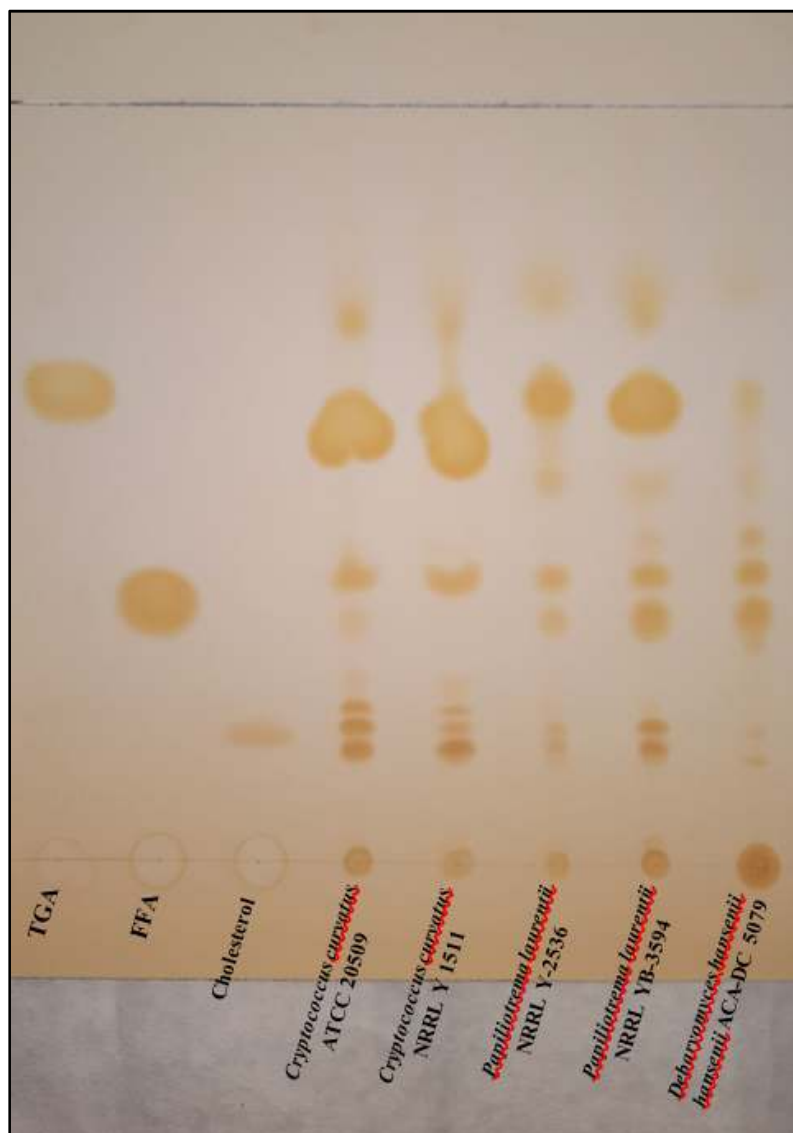
**Εικόνα 76.** Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων κατά την καλλιέργεια του *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079 σε φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα.



**Εικόνα 77.** Απεικόνιση α) των διαφορετικών, και ως προς το χρωματισμό, υγρών της καλλιέργειας, με το υγρό στην περίπτωση του *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079 να είναι πιο κίτρινο από το αντίστοιχο του *Cryptococcus curvatus* NRRL Y 1511 και β) του στερεού κίτρινου λίπους αριστερά, σε σύγκριση με το διαφανές έλαιο δεξιά, αντίστοιχα.

### 4.3. Διαχωρισμός κλασμάτων μέσω Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας |

Τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, σε πλάκα πυριτίου, παρουσιάζονται στην Εικόνα 75 και αφορούν δείγματα από τις καλλιέργειες των μικροοργανισμών στο δευτερογενές τυρόγαλα. Το δείγμα για τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509 αντιστοιχούσε στις 49 ώρες καλλιέργειας, για τον *C. curvatus* NRRL Y-1511 αντιστοιχούσε στις 170 ώρες, όπως και για τον *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079, ενώ για τους *P. laurentii* NRRL Y-2536 και *P. laurentii* NRRL YB-3594 στις 100,5 ώρες.



Εικόνα 78. Απεικόνιση των διαφορετικών κλασμάτων ουδέτερων λιπιδίων σε πλάκα πυριτίου, μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας.

## 5. Συζήτηση – Συμπεράσματα

## 5.1. Σύνοψη |

---

Στην παρούσα ερευνητική εργασία ο κύριος σκοπός ήταν η μείωση του οργανικού φορτίου, σε ένα παραπροϊόν υψηλού ρυπαντικού δείκτη, μέσω της αξιοποίησής του ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη ζυμών. Η αξιοποίηση της πλειάδας θρεπτικών στοιχείων που ενυπάρχουν στο δευτερογενές τυρόγαλα, προς παραγωγή βιομάζας και μικροβιακών μεταβολιτών είναι το φυσικό επακόλουθο όφελος στο συγκεκριμένο εγχείρημα. Με βάση αυτά, ύστερα από ενδελεχή έλεγχο στη βιβλιογραφία, εντοπίστηκαν 8 στελέχη ζυμών και αξιολογήθηκε η ανάπτυξη τους σε καθορισμένο υπόστρωμα, με πηγή άνθρακα τη λακτόζη. Εκ των 8 καλλιεργηθέντων στελεχών, τα 5 εξ αυτών αναπτύχθηκαν στο καθορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα.

Ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509, στο καθορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με λόγο C/N=50 g/g εμφάνισε τη μεγαλύτερη παραγωγή λίπους (6 g/L) και κατ' επέκταση τη μέγιστη περιεκτικότητα ενδοκυτταρικών λιπιδίων (49% w/w) και παραγωγικότητα αυτών (0,028 g/L/h), σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των άλλων στελεχών ζυμών, στο ίδιο υπόστρωμα. Η καλλιέργεια του ίδιου στελέχους σε ακόμη φτωχότερο, αναφορικά με την πηγή αζώτου, θρεπτικό υπόστρωμα (C/N ίσο με 286 g/g και 410 g/g) οδήγησε σε ανάλογη συσσώρευση λιπιδίων (6,01 g/L και 8,65 g/L, αντίστοιχα, με το συντελεστή περιεκτικότητας της τελικής βιομάζας σε ενδοκυτταρικά λιπίδια,  $K_{\frac{P}{X}}$ , να είναι περί το 62% w/w και το 58%, αντιστοίχως). Αντιθέτως, στην καλλιέργεια του σε θρεπτικό υπόστρωμα πλούσιο σε πηγή αζώτου (C/N ίσο με 12,5 g/g), η ποσότητα των λιπιδίων ήταν σαφώς χαμηλότερη (1,52 g/L). Στις καλλιέργειες με υψηλό λόγο άνθρακα προς άζωτο (C/N ίσο με 286 g/g και 410 g/g), αν και καταναλώθηκε μόλις το 27% και 15% της λακτόζης, παρουσιάστηκαν οι μέγιστες παραγωγικότητες λίπους, 0,038 g/L/h και 0,054 g/L/h, αντίστοιχα. Η έλλειψη αζώτου, που θα ευνοούσε τη συνέχιση της κυτταροπλασίας, είχε ως αποτέλεσμα τη μέγιστη δυνατή συσσώρευση λίπους από τα ενυπάρχοντα κύτταρα. Θεωρώντας ότι το άζωτο καταναλώθηκε στο σύνολό του και η καταναλωθείσα λακτόζη ήταν 28,8 g/L και 33 g/L, τότε η τιμή του λόγου άνθρακα προς άζωτο του ιδανικού υποστρώματος βιοσυσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους για το συγκεκριμένο στέλεχος θα μπορούσε να είναι μεταξύ των τιμών 78-89 g/g.



Ο μικροοργανισμός *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα με λόγο άνθρακα προς άζωτο, C/N= 50 g/g, όμως η ποσότητα του λίπους ήταν μόλις 0,8 g/L, σε 12,1 g/L ξηρή βιομάζα ( $K\frac{P}{X}= 10\%$  w/w), με το υπόστρωμα όμως να μην καταναλώνεται πλήρως (καταναλώθηκαν 41,5 g/L λακτόζης). Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Candida curvata* D σε θρεπτικό υπόστρωμα λακτόζης και περιορισμό σε πηγή αζώτου, οδήγησε σε πολύ υψηλή παραγωγή ξηρής βιομάζας και λιπιδίων (12,5 g/L ξηρή βιομάζα, με 39,2% περιεκτικότητα σε ενδοκυτταρικά λιπίδια) (Evans & Ratledge, 1983). Σύμφωνα με τη μελέτη του Davies (1988), η κλειστού τύπου καλλιέργεια του *Apiotrichum curvatus* σε υπόστρωμα με λακτόζη, είχε ως απόρροια την παραγωγή 20,6 g/L ξηρής βιομάζας και 7,9 g/L ενδοκυτταρικά λιπίδια,  $K\frac{P}{X}= 39\%$  w/w. Στην εργασία της Tchakouteu και των συνεργατών της (2014), ο *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 καλλιεργήθηκε σε υποστρώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων λακτόζης (40, 60, 80 g/L), με τις πηγές αζώτου να παραμένουν ποσοτικά σταθερές, άρα τον λόγο C/N να βαίνει αυξανόμενος. Η αύξηση του λόγου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής λίπους (από 1,31 g/L σε λόγο 90 g/g σε 4,3 g/L σε λόγο 180 g/g και διάρκεια καλλιέργειας 528 ώρες). Σε υπόστρωμα με περίσσεια αζώτου και συγκέντρωση λακτόζης 40 g/L (C/N=17 g/g), ιδεατό για κυτταροπλασία, η ξηρή βιομάζα ισούτο με 19,7 g/L και το λίπος με 0,93 g/L. Στη συγκεκριμένη εργασία, παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο στέλεχος συσσωρεύει και ενδοπολυσακχαρίτες κατά την καλλιέργειά του σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα τη λακτόζη ή τη σακχαρόζη, ορισμένα ή σύνθετα, όπως το τυρόγαλα και η μελάσα.

Τα στελέχη του μικροοργανισμού *Papiliotrema laurentii*, που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα με λόγο C/N=50 g/g, δεν παρουσίασαν ιδιαίτερη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους (1,5 g/L και 1,0 g/L, με περιεκτικότητες  $K\frac{P}{X}$  ίσες με 11% και 9% w/w), όμως οι συντελεστές παραγωγικότητας ξηρής βιομάζας ήταν από τις πλέον υψηλές (0,14 g/L/h και 0,11 g/L/h), στη σειρά αυτή των πειραμάτων, για τα *P. laurentii* NRRL Y-2536 και *P. laurentii* NRRL YB-3594, αντίστοιχα. Ο μικροοργανισμός *Debaryomyces hansenii hansenii* ACA-DC 5079, καταναλώνοντας περί το 50% της λακτόζης του υποστρώματος, παρήγαγε 5,1 g/L ξηρή βιομάζα, με 11,7% w/w ενδοκυτταρικά λιπίδια, το δεύτερο υψηλότερο ποσοστό για το θρεπτικό υπόστρωμα με λόγο C/N=50 g/g (πίσω από τον *C. curvatus* ATCC 20509, με  $K\frac{P}{X}=$

49% w/w και ακολουθούμενος από τον *P. laurentii* NRRL Y-2536, με  $K_{X}^P = 11,4\%$  w/w).

## 5.2. Συγκριτική αξιολόγηση |

---

Τα πέντε επιτυχόντα, όσον αφορά την ανάπτυξή τους στο καθορισμένο υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη λακτόζη, μικροβιακά στελέχη ζυμών, καλλιεργήθηκαν στο φυγοκεντρημένο και διηθημένο δευτερογενές τυρόγαλα. Η υψηλότερη παραγωγή ξηρής βιομάζας παρατηρήθηκε από τον *C. curvatus* ATCC 20509 (22,7 g/L), ακολουθούμενη από την παραγωγή του *P. laurentii* NRRL Y-2536 (20,4 g/L). Το στέλεχος αυτό, υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης, αντί να συσσωρεύει λίπος (1,1g/L), φαίνεται να παράγει και να εκκρίνει εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες. Αναφορικά με την παραγωγή λίπους, ο *C. curvatus* ATCC 20509 και πάλι εμφάνισε την υψηλότερη τιμή (3,4 g/L), ακολουθούμενος αυτή τη φορά από τον *C. curvatus* NRRL Y-1511 (2,3 g/L). Όλα τα στελέχη εμφάνισαν τον ίδιο συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ( $Y_{S}^X=40\%$  w/w), πλην του *P. laurentii* NRRL YB-3594 ( $Y_{S}^X=27\%$  w/w). Ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 εμφάνισε το μεγαλύτερο, υπερδιπλάσιο του αμέσως επόμενου, συντελεστή απόδοσης παραγωγής προϊόντος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ( $Y_{S}^P=12\%$  w/w). Ο ίδιος μικροοργανισμός, όπως και ο *D. hansenii hansenii* ACA-DC 5079 εμφάνισαν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ενδοκυτταρικά λιπίδια ανά ξηρή βιομάζα ( $K_{X}^P=15\%$  w/w), ακολουθούμενοι από τον *C. curvatus* NRRL Y-1511 ( $K_{X}^P=13\%$  w/w). Η μεγαλύτερη παραγωγικότητα βιομάζας, ως φυσικό επακόλουθο, παρατηρήθηκε στον *C. curvatus* ATCC 20509 (0,23 g/L/h) και στον *P. laurentii* NRRL Y-2536 (0,2 g/L/h). Λόγω της μεγάλης διάρκειας της καλλιέργειας (170 ώρες) των *C. curvatus* NRRL Y-1511 και *D. hansenii hansenii* ACA-DC 5079, οι παραγωγικότητες ξηρής βιομάζας ήταν σαφώς μειωμένες (0,1 g/L/h και 0,05 g/L/h, αντίστοιχα), όπως και η παραγωγικότητα λιπιδίων για τον *D. hansenii hansenii* ACA-DC 5079 (0,007 g/L/h), εν αντιθέσει με τον *C. curvatus* NRRL Y-1511, που, αν και η καλλιέργεια καθυστέρησε, εμφάνισε τη δεύτερη υψηλότερη παραγωγικότητα λιπιδίων (0,013 g/L/h), κυρίως λόγω της χαμηλής λιποσυσσώρευσης των δύο στελεχών *P. laurentii*. Η ρύθμιση του pH έγινε δις στην καλλιέργεια του *C. curvatus*

ATCC 20509, ενώ μία φορά χρειάστηκε στις καλλιέργειες των *C. curvatus* NRRL Y-1511 και *D. hansenii hansenii* ACA-DC 5079. Στις καλλιέργειες των δύο στελεχών *P. laurentii* δεν χρειάστηκε κάποια επέμβαση.

Στις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών και του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων υπήρξαν αυξομειώσεις, στο σύνολο των καλλιεργειών. Η χαμηλή συσσώρευση λίπους σε όλους τους μικροοργανισμούς (μέγιστη συγκέντρωση λιπιδίων 15%) δεικνύει ότι το άζωτο ήταν παρόν στο υγρό της καλλιέργειας, καθ' όλη τη διάρκεια αυτής, με αποτέλεσμα να στρέφεται ο μεταβολισμός προς τη σύνθεση κυτταρικών οργανιδίων και, εν τέλει, νέων κυττάρων. Οι αυξομειώσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τις χρονικές περιόδους που υπήρχε διαθέσιμο άζωτο στο υγρό, ευνοούταν η κυτταροπλασσία, όταν αυτό ελαττωνόταν, η καταβολιζόμενη λακτόζη και το παραχθέν ακέτυλο-CoA οδηγούταν προς σύνθεση λιπαρών οξέων, ενώ, παράλληλα, ο μικροοργανισμός μέσω υδρολυτικών ενζύμων (πρωτεασών, πεπτιδασών) απελευθέρωνε αμινομάδες, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του αζώτου. Θεωρητικά, το δευτερογενές τυρόγαλα θα πρέπει να είναι ελεύθερο πρωτεϊνών. Οι κροκκιδωμένες πρωτεΐνες του ορού, όμως, διαπερνούν σε ένα ποσοστό τους το ειδικό τυρόπανο (τσαντίλα) και, εν συνεχεία, οι μικρού μεγέθους δεν διαχωρίζονται κατά τη φυγοκέντρωση και την διήθηση, οπότε και παραμένουν στο υλικό της καλλιέργειας, ως έμμεση πηγή αζώτου, διαθέσιμη ανά πάσα στιγμή που θα το χρειαστεί ο μικροοργανισμός και θα έχει τη δυνατότητα να υδρολύσει αυτά τα μόρια. Ιδανικά, θα πρέπει να κατακρατούνται πλήρως οι πρωτεΐνες του ορού, κατά την τυροκομική πρακτική παρασκευής τυριών τυρογάλακτος, τόσο για να αυξηθεί η ποσότητα του προϊόντος αυτού, όσο και να είναι το δευτερογενές τυρόγαλα απαλλαγμένο από αζωτούχες ενώσεις.

Διάφορες τεχνικές επεξεργασίας εφαρμόζονται στο δευτερογενές τυρόγαλα για να μειωθεί η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών και να ευνοηθεί η συσσώρευση λίπους. Από την προ-επεξεργασία που θα εφαρμοστεί, θα επηρεαστεί ο μεταβολισμός του μικροοργανισμού και, άρα, τα τελικά προϊόντα. Επιπρόσθετα, συχνά εφαρμόζεται συν-καλλιέργεια σε τυρόγαλα και κάποιο άλλο παραπροϊόν, όπως οινολάσπη (Kopsahelis *et al.*, 2018) και μελάσα (Castanha *et al.*, 2014). Όσο αυξάνεται η προ-επεξεργασία των παραπροϊόντων, αυξάνεται και το συνολικό κόστος παραγωγής των προϊόντων. Σε διήθημα τυρογάλακτος, που διηθήθηκε σε φίλτρο με πόρους

κατακράτησης ενώσεων, με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 50.000, καλλιεργήθηκε η ζύμη *Candida curvata* D για 80 ώρες, δίδοντας 13,8 g/L ξηρή βιομάζα με 55% ενδοκυτταρικά λιπίδια, σε μια προ-επεξεργασία που ευνόησε τη συσσώρευση λίπους (Floetenmeyer *et al.*, 1985). Στη μελέτη τους, οι Seo *et al.* (2014) εφάρμοσαν αλκαλική υδρόλυση (pH=9-12), σε συνδυασμό με υδραυλική σπηλαιώση (HC), μια τεχνική υπέρ-υψηλής πίεσης. Το όλον φυγοκεντρήθηκε και το τελικό pH ρυθμίστηκε στην τιμή 5,5. Η καλλιέργεια του στελέχους *Cryptococcus curvatus* KCTC 27583 στο επεξεργασμένο τυρόγαλα για μία ημέρα, οδήγησε σε υψηλές τιμές ξηρής βιομάζας, λιπιδίων, περιεκτικότητας και παραγωγικότητας αυτών (7,2 g/L, 4,68 g/L, 65% w/w και 0,195 g/L/h, αντίστοιχα), δεικνύοντας ότι και αυτή η προ-επεξεργασία οδήγησε σε συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων.

Στην εργασία τους, οι Castanha *et al.* (2014), το στέλεχος *Cryptococcus (Papiliotrema) laurentii* 11 καλλιεργήθηκε σε δευτερογενές τυρόγαλα, στο οποίο είχε προηγηθεί φυγοκέντρωση, με τα αποτελέσματα για την ξηρή βιομάζα, το λίπος και την παραγωγικότητα των λιπιδίων να είναι 4,57 g/L, 1,27 g/L και 0,005 g/L/h, αντίστοιχα. Η μελέτη των Carota *et al.* (2017) περιελάμβανε την αξιολόγηση ενός πλήθους 18 στελεχών ζυμών, ως προς την ανάπτυξή τους σε δευτερογενές τυρόγαλα, το οποίο προήλθε από την παρασκευή του τυριού τυρογάλακτος, ricotta. Στο υπόστρωμα προστέθηκε θειικό αμμώνιο προς επίτευξη λόγου άνθρακα προς άζωτο ίσο με 55 και καυστική σόδα, προς ρύθμιση του pH σε τιμή 5,5. Στα αξιόλογα αποτελέσματα της καλλιέργειας 72 ωρών συγκαταλέγεται η ανάπτυξη του *C. curvatus* NRRL Y-1511 με παραγωγή ξηρής βιομάζας 10,77 g/L και λιποσυσσώρευση 63% w/w και του *Cryptococcus laurentii* UCD 68-201 7,28 g/L, με 70% λιπίδια. Εν προκειμένω, παρατηρούμε πως μια μέση τιμή λόγου C/N οδηγεί σε υψηλή λιποσυσσώρευση.

Στελέχη του είδους *D. hansenii* δεν έχουν αναπτυχθεί ευρέως σε υπόστρωμα δευτερογενούς τυρογάλακτος προς παραγωγή βιομάζας και μικροβιακών λιπιδίων. Στην έρευνά τους, οι Arous *et al.* (2016) μελέτησαν την ανάπτυξη του στελέχους άλλης ζύμης, που ανήκει στο ίδιο γένος, του μικροοργανισμού *D. etchellsii* BM1, ο οποίος, μετά από 120 ώρες οδήγησε στην παραγωγή ξηρής βιομάζας 2,8 g/L, με 9,7% ενδοκυτταρικά λιπίδια (0,4 g/L), σε δευτερογενές τυρόγαλα, από το οποίο είχαν αφαιρεθεί οι πρωτεΐνες.

Το τυρόγαλα αποτελεί παραπροϊόν, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, ιδανικό για μικροβιακές καλλιέργειες και ρυπογόνο σε περίπτωση απόρριψης στο περιβάλλον. Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την ανάπτυξη σε αυτό στελεχών ζυμών, προς παραγωγή βιομάζας και μικροβιακών λιπιδίων (Πίνακας 20). Παρατηρώντας τον Πίνακα 20, ειδικά στη στήλη περί του θρεπτικού μέσου, γίνεται αντιληπτό ότι οι τεχνικές προεπεξεργασίας, που εφαρμόζονται σε αυτό είναι διαφορετικές και εξαρτώνται από το ίδιο το παραπροϊόν που έχουν να διαχειριστούν, αλλά και το σκοπό για τον οποίο το προορίζουν. Οι μεγαλύτερες τιμές λιποσυσσώρευσης παρατηρούνται σε τυρόγαλα που έχει υποστεί διήθηση και αφαίρεση των πρωτεϊνών ή τυρόγαλα που έχει υδρολυθεί, σε 6 δηλαδή από τις 14 περιπτώσεις που συγκεντρώθηκαν παρακάτω (και 6 από τις 9 βιβλιογραφικές εργασίες που συγκεντρώθηκαν από την ανασκόπηση, αν εξαιρέσουμε τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας). Συγκρίνοντας τα στελέχη του είδους *Cryptococcus curvatus* (και συνώνυμα) μεταξύ τους, παρατηρείται ότι η μέγιστη βιομάζα (22,7 g/L) προέρχεται από την παρούσα εργασία (στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509), ενώ και η δεύτερη υψηλότερη τιμή βιομάζας που καταγράφηκε στο παρόν (16,9 g/L) ανήκει στην τριάδα με τις υψηλότερες τιμές (στέλεχος *C. curvatus* NRRL Y-1511). Οι υψηλές τιμές βιομάζας, συνάμα με τις πλέον χαμηλές τιμές ενδοκυτταρικών λιπιδίων, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο υπόστρωμα, με τις τυροκομικές πρακτικές από τις οποίες προήλθε και την προ-επεξεργασία που εφαρμόστηκε, ενδείκνυται για κυτταροπλασία. Η τιμή της παραγωγικότητας βιομάζας (0,23 g/L/h) από τον *C. curvatus* ATCC 20509, αν και ήταν η υψηλότερη που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, σε σύγκριση με τις λοιπές παραγωγικότητες των στελεχών του είδους φαντάζει μέτρια, κυρίως λόγω του σαφώς μειωμένου χρόνου καλλιέργειας, που εφαρμόστηκε στις άλλες μελέτες.

Τα 2 στελέχη *P. laurentii* παρουσίασαν πολύ υψηλότερη παραγωγή βιομάζας, σε σύγκριση με τις 2 πειραματικές σειρές σε κωνικές φιάλες και κατ' επέκταση μεγάλη ήταν και η διαφορά μεταξύ των παραγωγικοτήτων βιομάζας. Δυσανάλογη ήταν, αναμενόμενα, η συσσώρευση λίπους. Το ιδιαίτερο σημείο στην ανάπτυξη του στελέχους *P. laurentii* Y-2536 ήταν η έκκριση εξω-πολυσακχαριτών. Τέλος, το στέλεχος *D. hansenii hansenii* ACA-DC 5079 εμφάνισε σαφώς υψηλότερες τιμές σε όλες τις κατηγορίες που υπολογίστηκαν, σε σύγκριση με το στέλεχος *D. etchellsii* BM1.

**Πίνακας 20.** Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και συγκέντρωση των επιμέρους αποτελεσμάτων, προς συγκριτική αξιολόγηση, από την ανάπτυξη των αντίστοιχων ζυμών σε υπόστρωμα τυρογάλακτος.

Μικροοργανισμός	Καλλιέργεια	Θρεπτικό μέσο	Ξηρή Βιομάζα (g L <sup>-1</sup> )	Λίπος (g L <sup>-1</sup> )	$\frac{K^P}{X}$ (% g/g)	Παραγωγικότητα βιομάζας (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Παραγωγικότητα λιπιδίων (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Βιβλιογραφική πηγή
<i>Apiotrichum curvatum</i> ATCC 20509	Batch Bioreactor 39 h	Cheese Whey Permeate	21,6	7,78	36	0,55	0,200	Ykema <i>et al.</i> (1988)
<i>Cryptococcus curvatus</i> KCTC 27583	Shake flasks 24 h	Alkaline+ Hydlrodynamic Cavitation Pretreatment in Cheese Whey	7,2	4,68	65	0,30	0,195	Seo <i>et al.</i> (2014)
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	Shake flasks 72 h	Second Cheese Whey	10,77	6,83	63	0,15	0,094	Carota <i>et al.</i> (2017)
<i>Candida curvata</i> D	Batch Bioreactor 80 h	Cheese Whey Permeate	13,8	7,59	55	0,17	0,095	Floetenmeyer <i>et al.</i> (1985)
	Continuous Bioreactor D=0,02 h <sup>-1</sup>	Cheese Whey Permeate	14,2	7,2	51	0,28	0,144	
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	Shake flasks 100,5 h	Centr. & Filtr. Second Cheese Whey	22,7	3,4	15	0,23	0,040	Παρούσα μελέτη
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	Shake flasks 170 h	Centr. & Filtr. Second Cheese Whey	16,9	2,3	13	0,10	0,013	Παρούσα μελέτη
<i>Cryptococcus laurentii</i> UCD 68-201	Shake flasks 72 h	Second Cheese Whey	7,28	5,06	70	0,10	0,070	Carota <i>et al.</i> (2017)
	Batch Bioreactor 60 h	Second Cheese Whey	14,37	9,93	69	0,24	0,165	
<i>Cryptococcus laurentii</i> 11	Shake flasks 240 h	Centrifuged Cheese Whey	4,57	1,27	28	0,02	0,005	Castanha <i>et al.</i> (2014)
<i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL Y-2536	Shake flasks 100,5 h	Centr. & Filtr. Second Cheese Whey	20,4	1,1	6	0,20	0,010	Παρούσα μελέτη
<i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL YB-3594	Shake flasks 100,5 h	Centr. & Filtr. Second Cheese Whey	14,7	0,9	6	0,15	0,010	Παρούσα μελέτη
<i>Debaryomyces etchellsii</i> BM1	Shake flasks 120 h	Deproteinized Cheese Whey	2,8	0,4	9,7	0,02	0,003	Arous <i>et al.</i> (2016)
<i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> ACA-DC 5079	Shake flasks 170 h	Centr. & Filtr. Second Cheese Whey	8,3	1,2	15	0,05	0,007	Παρούσα μελέτη

Στην παρούσα εργασία, μέσω της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδος, εδείχθη ότι τα στελέχη *P. laurentii* NRRL Y-2536, *P. laurentii* NRRL YB-3594, *C. curvatus* ATCC 20509 και *C. curvatus* NRRL Y-1511 συσσωρεύουν τα λιπίδιά τους, κυρίως, υπό μορφή τριακυλογλυκερολών, το οποίο είναι υψίστης σημασίας. Για τα ενδοκυτταρικά λιπίδια στο *D. hansenii hansenii* ACA-DC 5079 παρατηρείται κυρίως η παρουσία υπό μορφή ελεύθερων λιπαρών οξέων κι όχι υπό αποθησαυριστικές ενώσεις. Μέσω της εστεροποίησης των λιπαρών οξέων και της επακόλουθης αέριας



χρωματογραφίας, προσδιορίστηκε η ποσοστιαία περιεκτικότητα του λίπους σε συγκεκριμένα λιπαρά οξέα (Πίνακας 21).

**Πίνακας 21.** Καταγραφή των κύριων λιπαρών οξέων, των οποίων η ποσοστιαία περιεκτικότητα προσδιορίστηκε μέσω αέριας χρωματογραφίας.

Μικροοργανισμοί	Λιπαρά Οξέα / Περιεκτικότητα (%)										
	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	SFA	UFA	MUFA	P.U.F.A.
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	0,5	0,2	29,3	1,2	10,3	52,8	5,7	40,1	59,9	54,2	5,7
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y 1511	0,8	1,2	26,3	0,2	14,9	47,3	9,3	42,0	58,0	48,7	9,3
<i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL Y-2536	3,6	2,5	28,2	0,6	14,7	46,1	4,3	46,5	53,5	49,2	4,3
<i>Papiliotrema laurentii</i> NRRL YB-3594	0,9	0,5	19,1	0,3	14,4	56,4	8,3	34,5	65,5	57,2	8,3
<i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> ACA-DC 5079	5,1	3,7	26,3	12,0	6,2	44,8	1,9	37,7	62,3	60,4	1,9

Από τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας, γίνεται αντιληπτό ότι στην πλειονότητά τους τα λιπίδια, που συνέθεσαν και οι πέντε μικροοργανισμοί, είναι ακόρεστα. Τα μεγαλύτερα ποσοστά ακορεστότητας παρατηρήθηκαν στα λιπαρά οξέα των στελεχών *P. laurentii* NRRL YB-3594(65,5%) και *D. hansenii hansenii* ACA-DC 5079 (62,3%), ενώ ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων άνω του 40% εμφάνισαν τα υπόλοιπα 3 στελέχη, *C. curvatus* ATCC 20509 (40,1%), *C. curvatus* NRRL Y-1511 (42%) και *P. laurentii* NRRL Y-2536 (46,5%), το οποίο ήταν το στέλεχος με τα λιγότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Το ελαϊκό οξύ (C18:1) κυριάρχησε μεταξύ των 7 λιπαρών οξέων που προσδιορίστηκαν, σε όλα τα στελέχη, ακολουθούμενο από το παλμιτικό οξύ (C16:0) και το στεατικό οξύ (C18:0). Για την περίπτωση του στεατικού οξέος, όλα τα στελέχη εμφάνισαν ποσοστό μεγαλύτερο του 10%, πλην του *D. hansenii hansenii* ACA-DC 5079 (6,2%), το οποίο όμως εμφάνισε μεγάλη περιεκτικότητα (12%) στο παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), δεκαπλάσια από την αμέσως επόμενη περιεκτικότητα στο συγκεκριμένο λιπαρό οξύ. Σχετικά με τα δύο λιπαρά οξέα, μυριστικό (C14:0) και μυριστελαϊκό (C14:1), οι περιεκτικότητες ήταν πολύ χαμηλές (0,2-1,2%), εκτός από το στέλεχος και *P. laurentii* NRRL Y-2536 (3,6% και 2,5%, αντίστοιχα) που ήταν ελαφρώς αυξημένες και στο στέλεχος *D. hansenii hansenii* ACA-DC 5079, που εμφάνισε τις υψηλότερες τιμές (5,1% και 3,7%, αντίστοιχα). Αναφορικά με το πολύ-ακόρεστο λιπαρό οξύ, λινελαϊκό (C18:2), η υψηλότερη τιμή παρατηρήθηκε στο λίπος του *C. curvatus* NRRL Y-1511 (9,3%), ενώ η χαμηλότερη στο λίπος του μικροοργανισμού *D. hansenii hansenii* ACA-DC 5079 (1,9%). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, με τα στοιχεία του Πίνακα 23 (Orsanova *et al.*, 2015) και της σύστασης του λίπους του κακάο [παλμιτικό – στεατικό – ελαϊκό 28:35:35% w/w] (Ochsenreither *et al.*, 2016) σχετικά με την περιεκτικότητα των φυτικών ελαίων στα διάφορα λιπαρά οξέα και ειδικά για τα 3 λιπαρά οξέα που ήταν σε πλειονότητα (παλμιτικό – στεατικό – ελαϊκό),

παρατηρούμε ότι το, πλούσιο σε ελαϊκό οξύ, λίπος των ζυμών, δεν ομοιάζει επακριβώς με κάποιο από τα φυτικά αυτά έλαια. Τα φυτικά έλαια είναι ακόρεστα σε ποσοστό άνω του 85%, με πολύ υψηλή περιεκτικότητά σε πολυακόρεστα, εκτός από το λίπος καρύδας (άνω του 90% κορεσμένο) και το λίπος του κακάο (περί το 60-65% κορεσμένο). Τα φυτικά έλαια, επίσης, είναι πλούσια σε λινελαϊκό οξύ, ακόμη και αυτά που εμπεριέχουν υψηλή ποσότητα ελαϊκού οξέος. Το στεατικό οξύ στο λίπος των ζυμών ήταν αυξημένο σε σχέση με τα φυτικά έλαια. Η υψηλή περιεκτικότητα του λίπους των ζυμών σε ελαϊκό οξύ (περί το 50% w/w) συνάμα με τη χαμηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό, το καθιστούν ως ενδιαφέρουσα πρώτη ύλη για την παραγωγή «2<sup>ης</sup> γενιάς» βιοντίζελ, αξιοποιώντας υποστρώματα ευτελούς αξίας, αντί για καλλιέργεια, πλούσιων σε έλαια, φυτών σε αρόσιμες καλλιεργήσιμες εκτάσεις, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών κι όχι των ενεργειακών. Στον Πίνακα 22 αναγράφονται τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχουν οι σχηματιζόμενοι εστέρες του συγκεκριμένου λίπους για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμο, σύμφωνα με την επιτροπή του Worldwide Fuel Charter (2009).

**Πίνακας 22.** Καταγραφή των προδιαγραφών που πρέπει να έχουν οι μεθυλεστέρες, ώστε να μπορούν να αξιοποιηθούν ως βιοκαύσιμο και των μεθόδων ελέγχου των χαρακτηριστικών αυτών.

Summary of Guidelines				Property			
Property	Value	Units	Test Methods	Value	Units	Test Methods	
Ester content	96.5 min	% m/m	EN 14103 mod Other: ABNT NBR 15342	Flash Point	100 min	°C	Other: ABNT NBR 10441 ISO 3679 ASTM D93
Linolenic Acid Methyl Ester	12.0 max	% m/m	EN 14103 mod	Cetane Number	51 min		ISO 5165 ASTM D613 JIS K2280
Polyunsaturated acid methyl ester (≥4 double bonds)	1 max	% m/m	prEN 15779	Water	500 max	mg/kg (ppm)	EN 12937
Oxidation Stability: Induction Period	10 min	hr	prEN 15751 or EN 14112 as alternative	Water and Sediment	0.05 max	% v/v	ASTM D2709 EN 12662
Iodine Number	130 max <sup>1</sup>	g I <sub>2</sub> /100 g	EN 14111	Total Contamination	24 max	mg/kg	ASTM D2276, D5452, D6217
Total Acid Number	0.5 max	mg KOH/g	ISO 6618 ASTM D664, D974 JIS K2501 Other: ABNT NBR 14448	Ash Content	0.001 max	% m/m	ISO 6245 ASTM D482 JIS K2272
Methanol	0.20 max	% m/m	EN 14110 JIS K2536 Other: ABNT NBR 15343	Sulfated Ash	0.005 max	% m/m	ISO 3987 ASTM D874 Other: ABNT NBR 984
Glycerides			EN 14105	Carbon Residue: Ramsbottom, on 100% distillation residue	0.05 max	% m/m	ASTM D4530
Mono-glyceride	0.80 max	% m/m	EN 14105 ASTM D6584 Other: ABNT NBR 15342	Corrosion: Ferrous	light rusting, max	Rating	ASTM D665 Procedure A
Di-glyceride	0.20 max	% m/m	EN 14105 ASTM D6584 Other: ABNT NBR 15342	Sulfur	10 max	ppm	EN 20846/20884 ASTM D5453/D2622 JIS K3541-1, -2, -6 or -7
Tri-glyceride	0.20 max	% m/m	EN 14105 ASTM D6584 Other: ABNT NBR 15342	Phosphorus	4 max	mg/kg	EN 14107 ASTM D4951, D3231
Glycerin (glycerol)				Alkali metals (Na+K)	5 max	mg/kg	EN 14108/14109, EN 14538
Free glycerin	0.02 max	% m/m	EN 14105/14106 ASTM D6584 Other: ABNT NBR 15341	Alkaline metals (Ca+Mg)	5 max	mg/kg	EN 14538
Total glycerin	0.25 max	% m/m	EN 14105 ASTM D6584 Other: ABNT NBR 15344	Trace Metals	no addition		ASTM D7111
Density	report	g/ml	EN ISO 3675 ASTM D4052 JIS K2249 Other: EN ISO 12185, ABNT NBR 7148/14065				
Kinematic Viscosity@40°C	2.0 - 5.0 <sup>2</sup>	mm <sup>2</sup> /s	EN ISO 3104 ASTMD445 JIS K2283				

<sup>1</sup> This limit may unnecessarily preclude certain feedstocks. Some engine technologies may need a more stringent limit.

<sup>2</sup> For temperatures at or below -20°C, viscosity should be at or below 48 mm<sup>2</sup>/s to avoid potentially dangerous loads on the fuel injection pump drive system.

**Πίνακας 23.** Καταγραφή της ποσοστιαίας περιεκτικότητας των φυτικών ελαίων στα διάφορα λιπαρά οξέα (Orsavona *et al.*, 2015).

FAs [%]	SAF	GRP	SIL	HMP	SFL	WHG	PMS	SES	RB	ALM	RPS	PNT	OL	COC
C6:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.52
C8:0	nd	0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7.6
C10:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.01	nd	nd	5.5
C12:0	nd	0.01	0.01	nd	0.02	0.07	nd	nd	nd	0.09	nd	nd	nd	47.7
C14:0	0.10	0.05	0.09	0.07	0.09	nd	0.17	nd	0.39	0.07	nd	0.04	nd	19.9
C15:0	nd	0.01	0.02	nd	nd	0.04	nd	nd	nd	nd	0.02	nd	nd	nd
C16:0	6.7	6.6	7.9	6.4	6.2	17.4	13.1	9.7	20.0	6.8	4.6	7.5	16.5	nd
C17:0	0.04	0.06	0.06	0.05	0.02	0.03	0.13	nd	nd	0.05	0.04	0.07	nd	nd
C18:0	2.4	3.5	4.5	2.6	2.8	0.7	5.7	6.5	2.1	2.3	1.7	2.1	2.3	2.7
C20:0	nd	0.16	2.6	nd	0.21	nd	0.47	0.63	nd	0.09	nd	1.01	0.43	nd
C22:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.14	nd	nd	nd	nd	0.15	nd
C16:1 (n-7)	0.08	0.08	0.05	0.11	0.12	0.21	0.12	0.11	0.19	0.53	0.21	0.07	1.8	nd
C17:1 (n-7)	nd	nd	0.03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C18:1cis (n-9)	11.5	14.3	20.4	11.5	28.0	12.7	24.9	41.5	42.7	67.2	63.3	71.1	66.4	6.2
C18:1trans (n-9)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.14	nd	nd	nd
C20:1(n-9)	nd	0.40	0.15	16.5	0.18	7.91	1.08	0.32	1.11	0.16	9.1	nd	0.30	nd
C18:2cis (n-6)	79.0	74.7	63.3	59.4	62.2	59.7	54.2	40.9	33.1	22.8	19.6	18.2	16.4	1.6
C18:3 (n-3)	0.15	0.15	0.88	0.36	0.16	1.2	0.12	0.21	0.45	nd	1.2	nd	1.6	nd
C18:3 (n-6)	nd	nd	nd	3.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S.F.A.s	9.3	10.4	15.1	9.2	9.4	18.2	19.6	16.9	22.5	9.3	6.3	10.7	19.4	92.1
M.U.F.A.s	11.6	14.8	20.7	28.1	28.3	20.9	26.1	42.0	44.0	67.9	72.8	71.1	68.2	6.2
P.U.F.A.s	79.1	74.9	64.2	62.8	62.4	61.0	54.3	41.2	33.6	22.8	20.9	18.2	18.0	1.6
n-3 P.U.F.A.s	0.2	0.2	0.9	0.4	0.2	1.2	0.1	0.2	0.5	0.0	1.2	0.0	1.6	0.0
n-6 P.U.F.A.s	79.0	74.7	63.3	62.4	62.2	59.7	54.2	40.9	33.1	22.8	19.6	18.2	16.4	1.6

Η περιεκτικότητα σε κάθε λιπαρό οξύ εκφράζεται ως ποσοστό επί του συνόλου των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAMES).

nd: τα λιπαρά οξέα δεν προσδιορίστηκαν.

Οι συντομογραφίες των δειγμάτων σημαίνουν: SAF-κρόκος, GRP-σταφύλι, SIL-γαϊδουράγκαθο, HMP-κάνναβη, SFL-ηλιανθος, WHG-φύτρο σιταριού, PMS-σπόρος κολοκύθας, SES-σουσάμι, RB-πίτουρο ρυζιού, ALM-αμύγδαλο, RPS-κραμβέλαιο, PNT-φυστίκι, OL-ελαιόλαδο και COC-λίπος καρύδας.

### 5.3. Συμπεράσματα |

---

Όλα όσα αναπτύχθηκαν άνωθεν οδηγούν στα κάτωθι συμπεράσματα:

- Το τυρόγαλα είναι ένα παραπροϊόν, που μόνο ως απόβλητο δεν πρέπει να θεωρείται. Οι εφαρμογές αξιοποίησής του είναι πολλές και οδηγούν σε πληθώρα τελικών προϊόντων, υψηλότερης απ' αυτό αξίας. Η απόφαση για το πως θα αξιοποιηθεί εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως οι υλικοτεχνικές υποδομές, η δυναμικότητα της βιομηχανίας, η συνέργεια με άλλες μονάδες αξιοποίησης παραπροϊόντων, το καταρτισμένο ερευνητικό προσωπικό, η περιοχή των εγκαταστάσεων, η απορροφησιμότητα του τελικού προϊόντος από την αγορά και φυσικά το κόστος παραγωγής του. Πολύ συχνό είναι και το φαινόμενο συγκαλλιέργειας του τυρογάλακτος με άλλα υποστρώματα. Ο σχεδιασμός, λοιπόν, της επεξεργασίας και της αξιοποίησης του παραπροϊόντος από μια τυροκομική μονάδα θα πρέπει να είναι εξατομικευμένος και ολοκληρωμένος.
- Μέσω της ανασκόπησης της βιβλιογραφίας εδείχθη ότι το θρεπτικό υπόστρωμα που ορίζεται, καθολικά, ως τυρόγαλα, κάθε φορά έχει ελαφρώς διαφορετικά χαρακτηριστικά, λόγω του τυριού που παρασκευάζεται, του γάλακτος που χρησιμοποιείται και των πρωτογενών επεξεργασιών που εφαρμόζονται για απομόνωση των πρωτεϊνών του ορού προς παρασκευή σκόνης, συμπυκνωμάτων ή τυριών τυρογάλακτος. Λόγω αυτού, η βιοτεχνολογική διεργασία καλλιέργειας μικροοργανισμών μπορεί να δίδει σε κάθε περίπτωση διαφορετικά αποτελέσματα. Από τα πειράματα επιβεβαιώθηκε ότι η λιποσυσσώρευση χωρεί εν τη απουσία αζώτου, το οποίο, όμως, στο θρεπτικό μέσο που αξιοποιήθηκε στην εν λόγω εργασία ήταν παρόν και ευνοούσε τη κυτταροπλασία. Εν ολίγοις, η προ-επεξεργασία της φυγοκέντρωσης και διήθησης με απλό διηθητικό χαρτί δεν ήτο επαρκείς για την αφαίρεση των αζωτούχων ενώσεων από το υγρό της καλλιέργειας.
- Οι τεχνικές διήθησης και, ειδικά, η υπερδιήθηση ανήκει στους τρόπους επεξεργασίας, που θα οδηγούσαν σε διήθημα πλούσιο σε λακτόζη, χωρίς κροκκιδωμένες οροπρωτεΐνες.
- Σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μελέτες, στην παρούσα εφαρμόστηκε χαμηλού κόστους προ-επεξεργασία, δίδοντας υψηλή συγκέντρωση παραχθείσης ξηρής

βιομάζας, η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα στο σιτηρέσιο του ζωικού κεφαλαίου.

- Τα τέσσερα από τα πέντε στελέχη (πλην του *D. hansenii hansenii* ACA-DC 5079), των οποίων η ανάπτυξη αξιολογήθηκε στο δευτερογενές τυρόγαλα, συσσωρεύουν λιπίδια υπό μορφή τριακυλογλυκερολών, με τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας να δείχνουν ότι τα τριγλυκερίδια αυτά εμπεριέχουν κυρίως ακόρεστα λιπαρά οξέα, με κυρίαρχο λιπαρό να είναι το ελαϊκό οξύ.
- Τα παραχθέντα λιπίδια δύνανται να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή «2<sup>ης</sup> γενιάς» βιοντίζελ.
- Το υγρό της ζύμωσης μπορεί να αξιοποιηθεί ως υπόστρωμα καλλιέργειας αυτότροφων μικροοργανισμών.

## 5.4. Μελλοντικοί στόχοι |

---

Τα αποτελέσματα οδήγησαν σε συμπεράσματα, τα οποία ανέδειξαν εναλλακτικές, που θα μπορούσαν να αξιολογηθούν:

- Εφαρμογή μικρο- ή υπερδιήθησης προς απομάκρυνση των κροκιδωμένων πρωτεϊνών του ορού, που προέκυψαν κατά τη διαδικασία παρασκευής του τυριού τυρογάλακτος, ούτως ώστε να αξιολογήσουμε την ανάπτυξη των ελαιογόνων ζυμών στο αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλα.
- Αξιοποίηση του τελικού υγρού της καλλιέργειας, απ' το οποίο έχει αφομοιωθεί πλήρως η λακτόζη, προς καλλιέργεια αυτότροφων μικροφυκών, με στόχο την πλήρη απορρύπανση και την παράλληλη παραγωγή επιπλέον προϊόντων προστιθέμενης αξίας, σε μια καλλιέργεια δύο σταδίων.
- Χρήση της παραγόμενης βιομάζας ως ζωοτροφή και αξιολόγηση της επίδρασής της στη στομάχι του σώματος και του γάλακτος, ζώων γαλακτοπαραγωγής.
- Μελέτη της σύστασης των εξωπολυσακχαριτών, που εκκρίνονται από το στέλεχος *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536.



## **6. Βιβλιογραφικές αναφορές**

▪ **Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία**

- A.F.N.O.R. 1984. Recueil des normes françaises des corps gras, grains oléagineux et produits dérivés. 3rd éd. Paris: *Association Française pour normalisation*, p. 95.
- Akoh, C.C (ed). 2017. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Fourth Edition. Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, U.S.A.  
DOI: <https://doi.org/10.1201/9781315151854>
- Arous, F., Frikha, F., Triantaphyllidou, I.-E., Aggelis, G., Nasri, M., Mechichi, T. 2016. Potential utilization of agro-industrial wastewaters for lipid production by the oleaginous yeast *Debaryomyces etchellsii*. *Journal of Cleaner Production* 133: 899–909.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.040>
- Arous, F., Jaouani, A., Mechichi, T. 2019. Oleaginous microorganisms for simultaneous biodiesel production and wastewater treatment: a review, *Microbial Wastewater Treatment* 8: 153-174.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816809-7.00>
- Asunis, F., De Gioannis, G., Isipato, M., Muntoni, A., Poletini, A., Pomi, R., Rossi, A., Spiga, D. 2019. Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. *Bioresour. Technol.* 289: 121722  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121722>
- Asunis, F., De Gioannis, G., Dessì, P., Isipato, M., Lens, P.N.L., Muntoni, A., Poletini, A., Pomi, R., Rossi, A., Spiga, D. 2020. The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation. *Journal of Environmental Management* 276: 111240.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111240>
- Atkin, C., Witter, L.D., Ordal, Z.J. 1967. Continuous Propagation of *Trichosporon cutaneum* in Cheese Whey. *Applied microbiology* 15(6): 1339–1344.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/am.15.6.1339-1344.1967>
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Breuer, U. & Harms, H. 2006. *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23(6): 415–437.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/yea.1374>
- Carota, E., Crognale, S., D'Annibale, A., Gallo, A.M., Stazi, S.R., Petruccioli, M. 2017. A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. *Sci Total Environ.* 584-585: 554-560.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.068>

- Castanha, R.F., de Morais, L.A.S., Mariano, A.P., Monteiro, R.T.R. 2013. Comparison of two lipid extraction methods produced by yeast in cheese whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56(4): 629–636.  
DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000400013>
- Castanha, R.F., Mariano, A.P., de Morais, L.A., Scramin, S., Monteiro, R.T., (2014). Optimization of lipids production by *Cryptococcus laurentii* 11 using cheese whey with molasses. *Brazilian journal of microbiology*: [publication of the Brazilian Society for Microbiology] 45(2): 379–387.  
DOI: <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000200003>
- Chatzipaschali, A.A. & Stamatis, A.G. 2012. Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey: Current Status and Prospects. *Energies* 5: 3492–3525.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/en5093492>
- Cho, H.U. & Park, J.M. 2018. Biodiesel production by various oleaginous microorganisms from organic wastes. *Bioresource Technology* 256: 502–508.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.010>
- Čipinytė, V., Grigiškis, S., Baškys, E. 2009. Selection of fat-degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment. *Biologija* 55(3): 84-92.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2478/v10054-009-0014-3>
- Cortes, M.A.L.R.M., de Carvalho, C.C.C.R. 2015. Effect of carbon sources on lipid accumulation in *Rhodococcus* cells. *Biochemical Engineering Journal* 94: 100-105.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.017>
- Davies, R.J., (1988). Yeast oil from cheese whey-process development. In: Moreton, R.S. (ed.), *Single cell oil*. London: Longman
- De Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Poletini, A., Pomi, R., Spiga, D. 2014. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: influence of pH. *Int. J. Hydrogen Energy* 39: 20930-20941  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.046>
- Dellomonaco, C., Clomburg, J., Miller, E., Gonzalez, R. 2011. Engineered reversal of the  $\beta$ -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. *Nature* 476: 355–359.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10333>
- Eurostat. 2018. *Collection of cow's milk*.  
LINK: <https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/TAG00037/>
- Evans, C.T. & Ratledge, C. 1983. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids* 18(9): 623–629.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/bf02534673>
- Fleet, G. H. 2011. Yeast Spoilage of Foods and Beverages. *The Yeasts* 53–63.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00005-7>

- Floetenmeyer, M.D., Glatz, B.A., & Hammond, E.G. 1985. Continuous Culture Fermentation of Whey Permeate to Produce Microbial Oil. *Journal of Dairy Science* 68(3): 633–637.  
DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80869-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80869-9)
- 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.  
LINK: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13428781/>
- Fonseca, Á., Boekhout, T., Fell, J.W. 2011. *Cryptococcus Vuillemin* (1901). *The Yeasts* 138: 1661–1737.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00138-5>
- Friedman, M. 2004. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(3): 385–406.  
DOI: <https://doi.org/10.1021/jf030490p>
- Guo, M. 2019. Whey protein production, chemistry, functionality, and applications. U.S.A.: John Wiley & Sons, Inc.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119256052.index>
- Harrison, T.S., Chen, J., Simons, E., Levitz, S.M. 2002. Determination of the pH of the *Cryptococcus neoformans* vacuole. *Med Mycol* 40(3): 329-332.  
DOI: <https://doi.org/10.1080/mmy.40.3.329.332>
- Hartmann, A. & Gupta, N. 2016. Multiple routes of phosphatidylethanolamine biogenesis ensure membrane integrity of *Toxoplasma gondii*. PhD Thesis. Humboldt-Universität zu Berlin  
DOI: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.18075.26403>
- Hysa, E., Kruja, A., Rehman, N.U., Laurenti, R. 2020. Circular economy innovation and environmental sustainability impact on economic growth: an integrated model for sustainable development. *Sustainability* 12(12): 4831.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/su12124831>
- Jimmy, C. 1977. Public Papers of the Presidents of the United States: (ed. Best Books on, 1977) - ISBN: 9781623767648
- Karaouzas I. 2016 Agro-Industrial Wastewater Pollution in Greek River Ecosystems. In: Skoulikidis N., Dimitriou E., Karaouzas I. (eds) *The Rivers of Greece. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 59. Springer, Berlin, Heidelberg.  
DOI: [https://doi.org/10.1007/698\\_2016\\_453](https://doi.org/10.1007/698_2016_453)
- Kaur, R., Panwar, D., Panesar, P. S. 2020. Biotechnological approach for valorization of whey for value-added products. *Food Industry Wastes* 275–302.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817121-9.00013-9>
- Kaza, S., Yao, L., Bhada-Tata, P., Van Woerden, F. 2018. *What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050*. *Urban Development*, Washington, DC: World Bank. © World Bank. License: CC BY 3.0 IGO.  
LINK: <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/30317>

- Kilara, A., & Vaghela, M. N. 2018. Whey proteins. *Proteins in Food Processing* 93–126.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X>
- Kneese, A.V. 1988. The Economics of Natural Resources. *Population and Development Review*. 14(0): 281-309.  
DOI: <https://doi.org/10.2307/2808100>
- Kopsahelis, N., Dimou, C., Papadaki, A., Xenopoulos, E., Kyraleou, M., Kallithraka, S., Kotseridis, Y., Papanikolaou, S., Koutinas, A.A. 2017. Refining of wine lees and cheese whey for the production of microbial oil, polyphenol-rich extracts and value-added co-products. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 93(1): 257–268.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.5348>
- Lappa, I.K., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E., Kopsahelis, N. 2019. Cheese Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications. *Foods* (Basel, Switzerland), 8(8): 347.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/foods8080347>
- Lappa, I.K., Kachrimanidou, V., Papadaki, A., Stamatiou, A., Ladakis, D., Eriotou, E., Kopsahelis, N. 2021. A comprehensive bioprocessing approach to foster cheese whey valorization: On-site  $\beta$ -galactosidase secretion for lactose hydrolysis and sequential bacterial cellulose production. *Fermentation*. 7(3): 184  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation7030184>
- Ma, Y.L., 2006. Microbial oils and its research advance. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering* 4: 7-11.
- Madani, M., Enshaeieh, M., & Abdoli, A. 2017. Single cell oil and its application for biodiesel production. *Process Safety and Environmental Protection* 111: 747–756.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.08.027>
- Mawson, A.J. 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresour. Technol.* 47 (3): 195-203.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90180-5)
- McDonald, T., Wiesner, D. L., Nielsen, K. 2012. Cryptococcus. *Current biology: CB*, 22(14): R554–R555.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.040>
- Mhlongo, S.I., Ezeokoli, O.T., Roopnarain, A., Ndaba, B., Sekoai, P.T., Habimana, O., Pohl, C.H. 2021. The potential of single-cell oils derived from filamentous fungi as alternative feedstock sources for biodiesel production. *Front Microbiol.* 12:637381.  
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637381>
- Mollea, C., Marmo, L., Bosco, F. 2012. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: Mazzalupo I. (ed.). *Food industry*. INTECH.

DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/53159>

- Monfil, V. O. & Casas-Flores, S. 2014. Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture. *Biotechnology and Biology of Trichoderma* 8: 429–453.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00032-1>
- Moon, N.J., Hammond, E.G. Glatz, B. A. 1978. Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single-cell protein. *Journal of Dairy Science* 61(11): 1537–1547.  
DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83762-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83762-X)
- Najafpour, G. D. 2007. Single-Cell Protein. *Biochemical Engineering and Biotechnology* 14: 332–341.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-044452845-2/50014-8>
- Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., Syldatk, C. 2016. Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in Microbiology* 7.  
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01539>
- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Vicha, R., & Mlcek, J. 2015. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *International journal of molecular sciences* 16(6): 12871–12890.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms160612871>
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., Marc, I. 2001. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80(3-4): 215-224.  
DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1013083211405>
- <sup>a</sup>Papanikolaou, S. & Aggelis, G. 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(8): 1031–1051.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100014>
- <sup>b</sup>Papanikolaou, S. & Aggelis, G. 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(8): 1052–1073.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100015>
- Praphailong, W. & Fleet, G.H. 1999. DEBARYOMYCES. *Encyclopedia of Food Microbiology* 515–520.  
DOI: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0430>
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J. 2012. Cheese whey management: a review. *J Environ Manage* 15: 110:48-68.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Probst, K.V., Schulte, L.R., Durrett, T.P., Rezac, M.E., Vadlani, P.V. 2015. Oleaginous yeast: a value-added platform for renewable oils. *Critical Reviews in Biotechnology* 36(5): 942–955.

DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1064855>

Ratledge, C. 2013. Microbial oils: an introductory overview of current status and future prospects. *OCL* 20(6): D602.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1051/ocl/2013029>

Ritala, A., Häkkinen, S.T., Toivari, M., Wiebe, M.G. 2017. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016. *Frontiers in microbiology* 8: 2009.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>

Rezapour-Firouzi, S. 2017. Herbal oil supplement with hot-nature diet for multiple sclerosis. *Nutrition and Lifestyle in Neurological Autoimmune Diseases* 229–245.

DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805298-3.00024-4>

Ruhemann, S. 1910. Triketohydrindene Hydrate. *Journal of the Chemical Society Transactions*. 97(0): 2025–2031.

DOI: <https://doi.org/10.1039/CT9109702025>

Sarantou, S., Stoforos, N.G., Kalantzi, O., Papanikolaou, S. 2021. Biotechnological valorization of biodiesel-derived glycerol: Trials with the non-conventional yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium* sp. *Carbon Resources Conversion* 4: 61–75.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2020.12.006>

Seo, Y.H., Lee, I., Jeon, S.H., Han, J.-I. 2014. Efficient conversion from cheese whey to lipid using *Cryptococcus curvatus*. *Biochemical Engineering Journal* 90: 149–153.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.018>

Shouvik, S., Bikram, B., Jae-Hoon, H., El-Sayed, S., Pradip, K.C., Byong-Hun, J. 2020. Microbial Symbiosis: A Network towards Biomethanation. *Trends in Microbiology* 28(12): 968-984.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.012>

Tchakouteu, S.S., Chatzifragkou, A., Kalantzi, O., Koutinas, A.A., Aggelis, G., Papanikolaou, S. 2014. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* exhibits interplay between biosynthesis of intracellular sugars and lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 117(5): 657–672.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201400347>

Takakuwa, N. & Saito, K. 2010. Conversion of beet molasses and cheese whey into fatty acid methyl esters by the yeast *Cryptococcus curvatus*. *Journal of Oleo Science* 59(5): 255–260.

DOI: <https://doi.org/10.5650/jos.59.255>

Takaç, S. & Şengel, B.Ş. 2009. Extracellular lipolytic enzyme activity of a newly isolated *Debaryomyces hansenii*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 40(1): 28–37.

DOI: <https://doi.org/10.1080/10826060903388820>

United Nations Foundation, (2015). *Sustainable Development Goals*.

LINK: <https://unfoundation.org/sustainable-development-goals/>



- United Nations, D.E.S.A., Population Division. *World Population Prospects 2019*.  
LINK: <http://population.un.org/wpp/>
- Viana, P.A., de Rezende, S.T., Passos, F.M.L., Machado, S.G., Maitan, G.P., da Silva Coelho, V.T., Guimarães, V.M., 2011.  $\alpha$ -Galactosidases production by *Debaryomyces hansenii* UFV-1. *Food Science and Biotechnology* 20(3): 601–606.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-011-0085-7>
- Wang, Y., Yan, R., Tang, L., Zhu, L., Zhu, D., Bai, F., 2019. Dimorphism of *Trichosporon cutaneum* and impact on its lipid production. *Biotechnology for Biofuels* 12(1).  
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1543-3>
- Worldwide Fuel Charter Committee. 2009. Biodiesel guidelines.  
LINK: [https://www.acea.auto/uploads/publications/20090423\\_B100\\_Guideline.pdf](https://www.acea.auto/uploads/publications/20090423_B100_Guideline.pdf)
- Wynn, J. P. & Ratledge, C. 2005. Microbial production of oils and fats. In: Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin R. E. (eds) *Food Biotechnology* 443–472, Second Edition Food Science and Technology, Boca Raton, FL: CRC Press.
- Yamauchi, S., Hatakeyama, S., Imai, Y., Tonouchi, M. 2013. Terahertz time-domain spectroscopy to identify and evaluate anomer in lactose. *American Journal of Analytical Chemistry* 4: 756-762.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2013.412092>
- Ykema, A., Verbree, E.C., Kater, M.M., Smit, H. 1988. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in whey permeate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 211–218.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00939309>
- Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., Casadevall, A. 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol.* 68: 133-216.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(09\)01204-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(09)01204-0)
- Zuccaro, G., Pirozzi, D., Yousuf, A. 2020. Lignocellulosic biomass to biodiesel. *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels* 4: 127–167.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815936-1.00004-6>

## ▪ Ελληνική Βιβλιογραφία

Α.Α.Δ.Ε. Άρθρο 79. 2016. ‘Συνθήκες και όροι παραγωγής και εμπορίας νοπού γάλακτος, θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος και προϊόντων με βάση το γάλα.’, ΙΧ. Προϊόντα ζωικής προέλευσης εκτός αυτών του Κεφαλαίου Χ, ΕΚΔΟΣΗ 6, Κώδικας Τροφίμων και Ποτών.

LINK: <https://www.aade.gr/sites/default/files/2020-03/79-iss1.pdf>

Α.Α.Δ.Ε. Άρθρο 80. 2016. ‘Είδη Γάλακτος’, ΙΧ. Προϊόντα ζωικής προέλευσης εκτός αυτών του Κεφαλαίου Χ, ΕΚΔΟΣΗ 6, Κώδικας Τροφίμων και Ποτών.

LINK: <https://www.aade.gr/sites/default/files/2020-03/80-iss6.pdf>

Α.Α.Δ.Ε. Άρθρο 83. 2016. ‘Τυροκομικά προϊόντα’, ΙΧ. Προϊόντα ζωικής προέλευσης εκτός αυτών του Κεφαλαίου Χ, ΕΚΔΟΣΗ 6, Κώδικας Τροφίμων και Ποτών.

LINK: <https://www.aade.gr/sites/default/files/2020-03/83-iss3.pdf>

Ανδρικόπουλος, Ν. 2015. Τροφογονωσία - Κεφαλαίο 8ο: Γενικές ιδιοτητες των πρωτεϊνων. Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών.

LINK: <http://hdl.handle.net/11419/4696>

Ανυφαντάκης Ε. 2004. Τυροκομία: Χημεία, Φυσικοχημεία, Μικροβιολογία, Β' Έκδοση, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα

ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ. 2020. Μηνιαίες παραδόσεις και μέση τιμή αγελαδινού γάλακτος 12-μήνου 2020, ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.

ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ. 2020. Παραδόσεις παραγωγών πρόβειου & γίδινου γάλακτος ανά περιφέρεια - νομό & μέση τιμή γάλακτος, ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΡΧΗ. 2020. Έρευνα παραγωγής και πωλήσεων βιομηχανικών προϊόντων (PRODCOM) ετών 2013-2014, Ελληνική Δημοκρατία, Αθήνα.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΡΧΗ. 2020. Ελλάς με Αριθμούς, Ιανουάριος – Μάρτιος 2020, Ελληνική Δημοκρατία, Αθήνα.

LINK: <https://www.statistics.gr/greece-in-figures>

ΚΑΜΙΝΑΡΙΔΗΣ, Σ. & ΜΟΑΤΣΟΥ, Γ. 2009. Γαλακτοκομία. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.

Μαντης, Α. 2015. Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Θεσσαλονίκη: Αφοί Κυριακίδη ΕΚΔΟΣΕΙΣ Α.Ε.

Μασσούρας, Θ., (2017). “Ελληνική Γαλακτοκομία: ‘Μοχλός’ Εξόδου Μας Από Την Κρίση”, *Dairy News*.

LINK: [Ελληνική γαλακτοκομία: ‘μοχλός’ εξόδου μας από την κρίση](#)

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2020. Κατάλογος προϊόντων Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) και Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (Π.Γ.Ε.) στα πλαίσια του Καν. (ΕΟΚ) αριθ. 510/06 του Συμβουλίου. Δ/ση Συστημάτων Ποιότητας και Βιολογικής Γεωργίας, Αθήνα

LINK:<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:31992R2081&from=EL>

Χατζηόλου, Β. 1941. Το πρόβλημα της κτηνοτροφίας εν Ελλάδι. Αθήνα: Ελληνική Εκδοτική Εταιρεία.

Χατζηηρήστου Σ., Θωμαΐδου Φ., Τσακανίκας Α. 2010. «Ελληνική Βιομηχανία Τροφίμων – Ποτών, Ετήσια Έκθεση 2009», Ελληνικές ηλεκτρονικές πηγές – IOBE.

- Έλεγχος λογοκλοπής μέσω Turnitin

MSc Thesis Vasilakis

---

ORIGINALITY REPORT

---

<b>2%</b> SIMILARITY INDEX	<b>2%</b> INTERNET SOURCES	<b>0%</b> PUBLICATIONS	<b>0%</b> STUDENT PAPERS
-------------------------------	-------------------------------	---------------------------	-----------------------------

---

PRIMARY SOURCES

---

<b>1</b>	<a href="http://www.minagric.gr">www.minagric.gr</a> Internet Source	<b>2%</b>
----------	---	-----------

---

Exclude quotes    On                      Exclude matches    < 2%

Exclude bibliography    On