



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ & ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:  
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Αξιοποίηση οξικού οξέος για παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων  
και μελέτη της εκχύλισης με πράσινους διαλύτες

**Απόστολος Ι. Πετρόπουλος**

Επιβλέπων καθηγητής:

Κουτίνας Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ 2023**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ & ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Αξιοποίηση οξικού οξέος για παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων  
και μελέτη της εκχύλισης με πράσινους διαλύτες

Valorization of acetic acid for microbial lipids production  
and study on their extraction with green solvents

**Απόστολος Ι. Πετρόπουλος**

Εξεταστική επιτροπή:

Κουτίνας Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

Τσιρώνη Θεοφανία, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

## Αξιοποίηση οξικού οξέος για παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και μελέτη της εκχύλισης με πράσινους διαλύτες

ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μηχανικής & Επεξεργασίας Τροφίμων

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί στην μελέτη και ανάπτυξη καινοτόμων διεργασιών με σκοπό τη μείωση της χρήσης ορυκτών πόρων και τη μετάβαση στην κυκλική οικονομία. Οι ανανεώσιμες πηγές άνθρακα αποτελούν δυνητικές πρώτες ύλες για παραγωγή χημικών και βιοπολυμερών στα πλαίσια μιας βιοτεχνολογικής προσέγγισης, όπου παρέχονται τα εργαλεία για τη βιομετατροπή σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Το οξικό οξύ αποτελεί μία χημική ένωση με μεγάλο ενδιαφέρον, τόσο ως πρόδρομη ένωση για την παραγωγή πολυμερών συσκευασίας όσο και για την αξιοποίησή του ως υπόστρωμα σε βιομηχανικές ζυμώσεις. Παράλληλα, η αυξανόμενη χρήση βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών έχει οδηγήσει στην ανάγκη για την ανάπτυξη διεργασιών με στόχο την ανακύκλωσή τους, ώστε να αποφεύγεται η συσσώρευσή τους στο περιβάλλον.

Στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκε το οξικό οξύ και υδρολύματα βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών ως υπόστρωμα για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Αρχικά, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509, *L. starkeyi* DSM 70296 και *R. toruloides* NRRL Y-27012 αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται και να παράγουν μικροβιακό λίπος με διάφορα εμπορικά οργανικά οξέα ως πηγή άνθρακα σε ασυνεχείς καλλιέργειες. Οι δύο πρώτοι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε όλα τα προς εξέταση υποστρώματα και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε παρόμοιες καλλιέργειες με μονομερή υδρολύματα βιοπολυμερών όπως το πολύ-γαλακτικό οξύ (PLA) και το πολύ-3-υδρόξυ-βουτυρικό (PHB). Το παραγόμενο μικροβιακό λίπος αποτελείται κατά κύριο λόγο από τα λιπαρά οξέα C16:0, C:18:0,  $\Delta^9$ C18:1 και  $\Delta^9, \Delta^{12}$ C18:2, σε όλα τα διαφορετικά υποστρώματα. Το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 αναπτύχθηκε σε ημι-συνεχή ζύμωση με οξικό οξύ παράγοντας 19,8 g/L βιομάζας με περιεκτικότητα σε λίπος 59,66% w/w, ενώ στην καλλιέργεια με υδρόλυμα PLA παράγαγε βιομάζα συγκέντρωσης 21,15 g/L με λιποπεριεκτικότητα της τάξης του 34,16% w/w στο τέλος της ζύμωσης.

Επιπλέον, μελετήθηκε η ανάκτηση των μικροβιακών λιπιδίων με τη χρήση πράσινων οργανικών διαλυτών με σκοπό την αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών πετροχημικής προέλευσης. Πραγματοποιήθηκαν διεργασίες για τον διαχωρισμό των λιπιδίων με διαφορετικούς χρόνους ανάδευσης, διαφορετικές θερμοκρασίες και με τη χρήση υπερήχων για τη διάτρηση των κυττάρων. Οι πράσινοι διαλύτες 1,3-διοξολάνη και οξικός αιθυλεστέρας οδήγησαν στην ανάκτηση του λίπους σε ποσοστά 93,62% και 83,36% λιπιδίων αντίστοιχα, με 24 ώρες ανάδευση στους 80°C και με τη χρήση υπερήχων, γεγονός που τους καθιστά ικανούς να αντικαταστήσουν το ευρέως χρησιμοποιούμενο εξάνιο.

**Επιστημονική περιοχή:** Βιομηχανική βιοτεχνολογία

**Λέξεις κλειδιά:** Οξικό οξύ, βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά, μικροβιακά λιπίδια, πράσινοι διαλύτες

## **Valorization of acetic acid for microbial lipids production and study on their extraction with green solvents**

*MSc Food Science and Technology  
Department of Food Science & Human Nutrition  
Laboratory of Food Process Engineering*

### **ABSTRACT**

In recent years, the scientific community has turned to the study and development of innovative processes to reduce the use of fossil fuels and transitioning to a circular economy. Renewable carbon sources are potential raw materials for the production of chemicals and biopolymers in the context of a biotechnological approach, that provides the tools for bioconversion into high added value products. Acetic acid is a chemical compound of great interest both as a precursor compound for the production of packaging polymers and for its use as a substrate in industrial fermentations. At the same time, the increasing use of biodegradable plastics has led to the need to recycle such compounds in order to avoid their accumulation in the environment.

In the present study, acetic acid and biodegradable plastics hydrolysates were utilized as substrates for the production of microbial lipids. Initially, the oleaginous microorganisms *C. curvatus* ATCC 20509, *L. starkeyi* DSM 70296 and *R. toruloides* NRRL Y-27012 were evaluated for their ability to grow and produce microbial lipids with various commercial organic acids as carbon sources in batch cultures. The first two microorganisms were grown on all the substrates tested and then subjected to similar cultures with monomer hydrolysates of biopolymers such as poly-lactic acid (PLA) and poly-3-hydroxy-butyrate (PHB). The produced microbial lipids was mainly composed of C16:0, C18:0, C18:1 and C18:2 fatty acids, in all different substrates. The strain *C. curvatus* ATCC 20509 was grown in fed-batch fermentation with acetic acid producing 19.8 g/L of biomass with a lipid content of 59.66% w/w, while in culture with PLA hydrolysate produced a biomass concentration of 21.15 g/L with a lipid content of 34.16% w/w at the end of the fermentation.

In addition, the recovery of microbial lipids using green organic solvents was studied in order to replace conventional solvents of petroleum origin. Processes were performed to separate the lipids with different stirring times, different temperatures

and using ultrasounds to penetrate the cells. The green solvents 1,3-dioxolane and ethyl acetate led to the recovery of oil in percentages of 93.62% and 83.36% of lipids respectively, with 24 hours of stirring at 80°C and using ultrasounds, making them capable of replacing the widely used hexane.

**Scientific area:** Industrial biotechnology

**Key words:** Acetic acid, biodegradable plastics, microbial lipids, green solvents

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων: Επεξεργασία, Συντήρηση και Βιοτεχνολογικές Διεργασίες Τροφίμων – Ανάπτυξη Προϊόντων Βιο-οικονομίας”.*

*Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον κ. Απόστολο Κουτίνα για την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης, την καθοδήγηση και την εξαιρετική συνεργασία μας, καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ. Παπανικολάου Σεραφείμ και κ. Τσιρώνη Θεοφανία για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.*

*Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Νικόλαο Γιαννάκη, για την αμέριστη συνεισφορά του κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας, καθώς συνέβαλε τα μέγιστα όλο αυτό το διάστημα των σπουδών μου, όπως και την μεταδιδάκτορα Ελένη Στυλιανού, η οποία ήταν αρωγός για την ολοκλήρωση της μελέτης μου.*

*Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου τα οποία ήταν διαθέσιμα να με βοηθήσουν οποιαδήποτε στιγμή και σε οποιοδήποτε πρόβλημα, όπως και τους συμφοιτητές μου που μοιραστήκαμε τα χρόνια των μεταπτυχιακών μας σπουδών.*

*Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου και τους φίλους μου, για τη στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.*

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.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

|  |      |
|--|------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....  | ii   |
| ABSTRACT.....  | iv   |
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....   | vi   |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....  | vii  |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....   | x    |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΙΚΩΝ.....  | xi   |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....   | xvi  |
| ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....  | xvii |
| 1. Εισαγωγή.....   | 1    |
| 1.1 Αξιοποίηση ανανεώσιμων πηγών άνθρακα.....                      | 2    |
| 1.1.1 Οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα.....                               | 3    |
| 1.1.2 Βιομηχανική παραγωγή οξικού οξέος.....                       | 4    |
| 1.1.2.1 Χρήση ρύπων προς παραγωγή οξικού οξέος.....                | 6    |
| 1.1.3 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση οξικού οξέος.....                  | 8    |
| 1.1.3.1 Βιοχημεία μικροβιακού μεταβολισμού.....                    | 9    |
| 1.1.3.2 Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας.....                | 11   |
| 1.1.4 Βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά.....                              | 14   |
| 1.2 Λιπίδια.....   | 17   |
| 1.2.1 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.....                              | 17   |
| 1.2.2 Βιοχημεία σύνθεσης και συσσώρευσης μικροβιακών λιπιδίων..... | 18   |
| 1.2.3 Εφαρμογές μικροβιακών λιπιδίων.....                          | 23   |
| 1.3 Εκχύλιση λιπιδίων.....   | 24   |
| 1.3.1 Δομή κυτταρικών τοιχωμάτων.....                              | 25   |
| 1.3.2 Προεπεξεργασία και διάτρηση κυττάρων.....                    | 26   |
| 1.3.3 Μέθοδοι εκχύλισης λιπιδίων.....                              | 28   |
| 1.3.4 Χρήση πράσινων διαλυτών.....                                 | 29   |



|   |    |
|---|----|
| 2. Σκοπός μελέτης .....   | 31 |
| 3. Υλικά και μέθοδοι .....  | 32 |
| 3.1 Μικροοργανισμοί.....  | 32 |
| 3.2 Παρασκευή προκαλλιέργειας .....   | 32 |
| 3.3 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων σε ασυνεχείς ζυμώσεις .....                       | 33 |
| 3.3.1 Υδροθερμική επεξεργασία βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών.....   | 34 |
| 3.4 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα.....  | 35 |
| 3.5 Εκχύλιση μικροβιακών λιπιδίων με χρήση πράσινων διαλυτών.....   | 36 |
| 3.5.1 Ημι-συνεχής ζύμωση για την παραγωγή μικροβιακής βιομάζας.....                                       | 36 |
| 3.5.2 Ανάκτηση κυτταρικής βιομάζας .....  | 37 |
| 3.5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πλήρους εκχύλισης μικροβιακών λιπιδίων .....                                | 38 |
| 3.5.4 Προσδιορισμός ανάκτησης λιπιδίων με χρήση πράσινων διαλυτών .....                                   | 39 |
| 3.6 Αναλυτικές μέθοδοι .....  | 41 |
| 3.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας.....  | 41 |
| 3.6.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πηγής άνθρακα.....   | 41 |
| 3.6.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων .....     | 42 |
| 3.6.4 Ποιοτικός προσδιορισμός μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων.....   | 43 |
| 3.6.5 Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων – Free Amino Nitrogen (FAN) .....                         | 44 |
| 4. Αποτελέσματα και συζήτηση.....   | 47 |
| 4.1 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση οργανικών οξέων προς παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις..... | 47 |
| 4.1.1 Ασυνεχείς ζυμώσεις με οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα .....   | 50 |
| 4.1.2 Ασυνεχείς ζυμώσεις με γαλακτικό οξύ ως πηγή άνθρακα.....  | 56 |
| 4.1.3 Ασυνεχείς ζυμώσεις με ηλεκτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα.....  | 60 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 4.1.4 | Ασυνεχείς ζυμώσεις με κροτονικό οξύ ως πηγή άνθρακα.....  | 64  |
| 4.1.5 | Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις με εμπορικά οργανικά οξέα ως πηγή άνθρακα .....  | 67  |
| 4.2   | Βιοτεχνολογική αξιοποίηση υδρολυμάτων βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών προς παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις .....     | 68  |
| 4.2.1 | Ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρόλυμα PLA ως πηγή άνθρακα .....  | 70  |
| 4.2.2 | Ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρόλυμα PHB ως πηγή άνθρακα .....  | 73  |
| 4.2.3 | Ασυνεχείς ζυμώσεις με μείγμα υδρολυμάτων PLA/PHB ως πηγή άνθρακα .....  | 79  |
| 4.2.4 | Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρολύματα βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών ..... | 82  |
| 4.3   | Βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα.....   | 83  |
| 4.3.1 | Ημι-συνεχής ζύμωση με οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 .....                           | 83  |
| 4.3.2 | Ημι-συνεχής ζύμωση με υδρόλυμα PLA ως πηγή άνθρακα με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 .....                        | 85  |
| 4.3.3 | Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις.....  | 86  |
| 4.4   | Εκχύλιση μικροβιακών λιπιδίων με χρήση πράσινων διαλυτών.....   | 88  |
| 4.4.1 | Ημι-συνεχής ζύμωση για την παραγωγή μικροβιακής βιομάζας με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 .....                  | 88  |
| 4.4.2 | Μελέτη της ανάκτησης μικροβιακών λιπιδίων .....   | 89  |
| 4.3.3 | Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά την εκχύλισή τους με πράσινους διαλύτες.....                            | 97  |
| 5.    | Συμπεράσματα .....  | 98  |
|       | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....  | 101 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 1. Μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων θρεπτικού μέσου .....  | 34 |
| Πίνακας 2. Συνοπτικά αποτελέσματα της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων από διαφορετικούς μικροοργανισμούς και διαφορετικές πηγές άνθρακα .....   | 48 |
| Πίνακας 3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων με οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα σε ασυνεχείς ζυμώσεις.....                     | 56 |
| Πίνακας 4. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις με εμπορικά οργανικά οξέα ως πηγή άνθρακα.....   | 67 |
| Πίνακας 5. Συνοπτικά αποτελέσματα της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων από διαφορετικούς μικροοργανισμούς και διαφορετικές πηγές άνθρακα .....   | 69 |
| Πίνακας 6. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρολύματα βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών ..... | 82 |
| Πίνακας 7. Βιβλιογραφική ανασκόπηση παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων με οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις.....                  | 85 |
| Πίνακας 8. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις.....  | 87 |
| Πίνακας 9. Βιβλιογραφική ανασκόπηση χρήσης πράσινων διαλυτών για την εκχύλιση μικροβιακών λιπιδίων.....  | 96 |
| Πίνακας 10. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων των μικροβιακών λιπιδίων με διαφορετικούς διαλύτες και σε διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης .....  | 97 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΙΚΩΝ

|   |    |
|---|----|
| Σχήμα 1. Καμπύλη αναφοράς της μεθόδου FAN .....   | 46 |
| Σχήμα 2. Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 6 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509.....      | 50 |
| Σχήμα 3. Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 6 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....       | 51 |
| Σχήμα 4. Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 6 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012.....  | 52 |
| Σχήμα 5. Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 18 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509.....     | 53 |
| Σχήμα 6. Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 18 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....      | 54 |
| Σχήμα 7. Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 18 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012..... | 55 |
| Σχήμα 8. Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. Curvatus</i> ATCC 20509..... | 57 |
| Σχήμα 9. Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....  | 58 |
| Σχήμα 10. Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012.....                                  | 58 |

|  |    |
|--|----|
| Σχήμα 11. Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. Curvatus</i> ATCC 20509.....     | 59 |
| Σχήμα 12. Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....      | 60 |
| Σχήμα 13. Κατανάλωση ηλεκτρικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 8 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. Curvatus</i> ATCC 20509.....      | 61 |
| Σχήμα 14. Κατανάλωση ηλεκτρικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 8 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....       | 62 |
| Σχήμα 15. Κατανάλωση ηλεκτρικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 8 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012 ..... | 62 |
| Σχήμα 16. Κατανάλωση ηλεκτρικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 17 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. Curvatus</i> ATCC 20509.....     | 63 |
| Σχήμα 17. Κατανάλωση ηλεκτρικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 17 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....      | 64 |
| Σχήμα 18. Κατανάλωση πηγών άνθρακα (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. Curvatus</i> ATCC 20509.....        | 65 |
| Σχήμα 19. Κατανάλωση 5 g/L κροτονικού οξέος (◆) και 5 g/L γλυκόζης (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. Curvatus</i> ATCC 20509 .....   | 65 |
| Σχήμα 20. Κατανάλωση πηγών άνθρακα (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....         | 66 |

|   |    |
|---|----|
| Σχήμα 21. Κατανάλωση 5 g/L κροτονικού οξέος (◆) και 5 g/L γλυκόζης (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 .....                                     | 66 |
| Σχήμα 22. Κατανάλωση υδρολύματος PLA (◇) αρχικής συγκέντρωσης 13 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. Curvatus</i> ATCC 20509..... | 70 |
| Σχήμα 23. Κατανάλωση υδρολύματος PLA (◇) αρχικής συγκέντρωσης 13 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....  | 71 |
| Σχήμα 24. Κατανάλωση υδρολύματος PLA (◇) αρχικής συγκέντρωσης 27 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. Curvatus</i> ATCC 20509..... | 72 |
| Σχήμα 25. Κατανάλωση υδρολύματος PLA (◇) αρχικής συγκέντρωσης 13 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....  | 73 |
| Σχήμα 26. Κατανάλωση υδρολύματος PHB (◇) αρχικής συγκέντρωσης 5 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. Curvatus</i> ATCC 20509.....  | 74 |
| Σχήμα 27. Κατανάλωση κροτονικού οξέος (◆) και 3HB (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. Curvatus</i> ATCC 20509 .....   | 74 |
| Σχήμα 28. Κατανάλωση υδρολύματος PHB (◇) αρχικής συγκέντρωσης 5 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....   | 75 |
| Σχήμα 29. Κατανάλωση κροτονικού οξέος (◆) και 3HB (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 .....  | 75 |
| Σχήμα 30. Κατανάλωση υδρολύματος PHB (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509..... | 76 |
| Σχήμα 31. Κατανάλωση κροτονικού οξέος (◆) και 3HB (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509.....  | 77 |

|  |    |
|--|----|
| Σχήμα 32. Κατανάλωση υδρολύματος PHB (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....                 | 78 |
| Σχήμα 33. Κατανάλωση κροτονικού οξέος (◆) και 3HB (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 .....   | 78 |
| Σχήμα 34. Κατανάλωση μείγματος υδρολυμάτων PLA/PHB (◇) αρχικής συγκέντρωσης 11 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 ..... | 79 |
| Σχήμα 35. Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◆), κροτονικού οξέος (◆) και 3HB (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 .....  | 80 |
| Σχήμα 36. Κατανάλωση μείγματος υδρολυμάτων PLA/PHB (◇) αρχικής συγκέντρωσης 11 g/L και FAN (✕) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....   | 81 |
| Σχήμα 37. Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◆), κροτονικού οξέος (◆) και 3HB (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....  | 81 |
| Σχήμα 38. Ημι-συνεχής ζύμωση για παραγωγή βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) με οξικό οξύ (◇) ως πηγή άνθρακα με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509.....                        | 84 |
| Σχήμα 39. Ημι-συνεχής ζύμωση για παραγωγή βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) με υδρόλυμα PLA (◇) ως πηγή άνθρακα με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509.....                     | 86 |
| Σχήμα 40. Ημι-συνεχής ζύμωση για παραγωγή βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) με γλυκόζη (◇) ως πηγή άνθρακα με τον μικροοργανισμό <i>C. curvatus</i> ATCC 20509.....                          | 89 |
| Σχήμα 41. Ανάκτηση λιπιδίων στους 25°C και ανάδευση για 1 ώρα .....  | 90 |
| Σχήμα 42. Ανάκτηση λιπιδίων στους 25°C και ανάδευση για 2 ώρες .....   | 90 |
| Σχήμα 43. Ανάκτηση λιπιδίων στους 40°C και ανάδευση για 1 ώρα .....  | 91 |
| Σχήμα 44. Ανάκτηση λιπιδίων στους 40°C και ανάδευση για 2 ώρες.....  | 91 |
| Σχήμα 45. Ανάκτηση λιπιδίων στους 40°C και ανάδευση για 12 ώρες .....  | 92 |

|  |    |
|--|----|
| Σχήμα 46. Ανάκτηση λιπιδίων με χρήση υπερήχων στους 40°C και ανάδευση για 12 ώρες..... | 92 |
| Σχήμα 47. Ανάκτηση λιπιδίων στους 60°C και ανάδευση για 12 ώρες.....                   | 93 |
| Σχήμα 48. Ανάκτηση λιπιδίων με χρήση υπερήχων στους 60°C και ανάδευση για 12 ώρες..... | 93 |
| Σχήμα 49. Ανάκτηση λιπιδίων με χρήση υπερήχων στους 60°C και ανάδευση για 24 ώρες..... | 94 |
| Σχήμα 50. Ανάκτηση λιπιδίων με χρήση υπερήχων στους 80°C και ανάδευση για 24 ώρες..... | 95 |



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

|   |    |
|---|----|
| Εικόνα 1. Παγκόσμιες εκπομπές CO <sub>2</sub> από τη χρήση ορυκτών καυσίμων και τη βιομηχανία και Ακαθάριστο Παγκόσμιο Προϊόν (\$US) εκφραζόμενο ως ισοτιμία αγοραστικής δύναμης (World Bank, 2018) από το 1990. .... | 2  |
| Εικόνα 2. Χημικές και βιολογικές μέθοδοι παραγωγής οξικού οξέος (Kim et al., 2021).....   | 5  |
| Εικόνα 3. Μεταβολικό μονοπάτι Wood-Ljungdahl ανάπτυξης βακτηρίων σε μίγματα αερίων που περιέχουν CO ή CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> (Kiefer et al., 2021) .....   | 7  |
| Εικόνα 4. Κύρια μεταβολικά μονοπάτια για μετατροπή οξικού οξέος σε υψηλής αξίας τελικά προϊόντα (Kim et al., 2021) .....  | 11 |
| Εικόνα 5. Συντεταγμένες βιοποικοδομησιμότητας και προέλευσης πλαστικών (European Bioplastics, 2011).....  | 15 |
| Εικόνα 6. Βιοχημεία συσσώρευσης τριγλυκεριδίων (TAGs) σε ελαιογόνες ζύμες (Caporusso et al., 2021).....   | 19 |
| Εικόνα 7. Σχηματισμός ενδοκυτταρικών τριακυλογλυκερολών μέσω της οδού α-φωσφορικής γλυκερόλης (Ratledge, 1988). ....  | 23 |
| Εικόνα 8. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες 500 mL (Erlenmeyer baffled flasks) .....   | 33 |
| Εικόνα 9. Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα Eppendorf, BioFlo 120 1 L ....  | 36 |
| Εικόνα 10. Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα Bioengineering, RALF Advanced 6.7 L .....  | 37 |
| Εικόνα 11. Κονιορτοποιημένη ξηρή βιομάζα της ζύμης <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 ..   | 38 |
| Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της συσκευής Soxhlet .....  | 39 |
| Εικόνα 13. Ανάδευση κυττάρων για την εκχύλιση λιπιδίων με χρήση διαλύτη α. χωρίς θέρμανση και β. με θέρμανση.....   | 40 |
| Εικόνα 14. Διήθηση βιομάζας και μεταφορά διαλύτη σε σφαιρικές φιάλες εξάτμισης .....  | 43 |
| Εικόνα 15. Μηχανισμός αντίδρασης νινυδρίνης με ελεύθερη αμινομάδα προς παραγωγή έγχρωμου συμπλόκου .....  | 45 |

## ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

|       |   |
|-------|---|
| 3-HP  | 3-υδροξύ-προπιονικό οξύ                         |
| ACC   | Καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA                     |
| ACKA  | Οξική κινάση                                    |
| ACL   | ΑΤΡ-κιτρική λυάση                               |
| ACS   | Συνθετάση ακέτυλο-CoA                           |
| AMP   | Μονοφωσφορική αδενοσίνη                         |
| ATP   | Τριφωσφορική αδενοσίνη                          |
| CAD   | Αποκαρβοξυλάση του ακονιτικού                   |
| CODH  | Αφυδρογονάση μονοξειδίου του άνθρακα            |
| DAGs  | Διακυλογλυκερόλες                               |
| FAS   | Συνθετάση λιπαρών οξέων                         |
| G-3-P | 3-φωσφορική γλυκερόλη                           |
| GAT   | G-3-P ακυλτρανφεράση                            |
| IAIA  | International Association for Impact Assessment |
| ICL   | Ισοκιτρική λυάση                                |
| IMP   | Μονοφωσφορική ινοσίνη                           |
| IPCC  | Intergovernmental Panel on Climate Change       |
| LB    | Λιποσωμάτια                                     |
| LDH   | Γαλακτική αφυδρογονάση                          |
| LPA   | Λυσοφωσφατιδικό οξύ,                            |
| MDH   | Μηλική αφυδρογονάση                             |
| MS    | Μηλική συνθάση                                  |
| NADPH | Φωσφορικό νικοτάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο     |
| PA    | Φωσφατιδικό οξύ                                 |
| PAP   | Φωσφοϋδρολάση του φωσφατιδικού οξέος            |

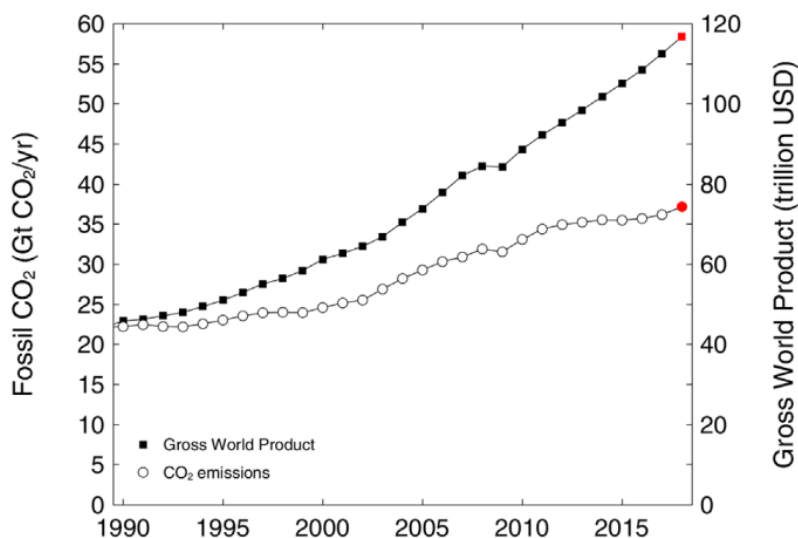
|      |                                     |
|------|-------------------------------------|
| PBAT | Τερεφθαλικό αδιπικό πολυ-βουτυλένιο |
| PBS  | Ηλεκτρικό πολυ-βουτυλένιο           |
| PDC  | Πυροσταφυλική αφυδρογονάση          |
| PEP  | Φωσφορο-ενολο-πυροσταφυλικό         |
| PET  | Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο           |
| PHAs | Πολυ-υδρόξυ-αλκανοϊκοί εστέρες      |
| PHB  | Πολύ-3-υδρόξυ-βουτυρικό             |
| PTA  | Φωσφοτρανσκετυλάση                  |
| SE   | Στερυλεστέρες                       |
| TAGs | Τριακυλογλυκερόλες                  |
| TCA  | Κύκλος τρικαρβοξυλικών οξέων        |
| VAM  | Μονομερές οξικού βινυλίου           |

## 1. Εισαγωγή

Σήμερα, ο πλανήτης μας έρχεται αντιμέτωπος με πολλές προκλήσεις. Η κλιματική αλλαγή, η αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού καθώς και οι αυξανόμενες ανάγκες σε τρόφιμα, φυσικούς πόρους και πρώτες ύλες αποτελούν κύρια θέματα στην ατζέντα της διεθνούς πολιτικής. Η χρήση ορυκτών καυσίμων αποτελεί την κύρια πηγή των εκπομπών του διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) και ευθύνεται για το 65% των παραγόμενων αερίων του θερμοκηπίου. Οι εκπομπές που προκύπτουν από τη χρήση ορυκτών καυσίμων αυξάνονται ραγδαία από τη δεκαετία του 1990 με τον ρυθμό αύξησης τα τελευταία χρόνια να βρίσκεται στο 0,9% ανά έτος (Jackson et al., 2019) (Εικόνα 1). Σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή για την Εκτίμηση των Επιπτώσεων (International Association for Impact Assessment, IAIA), το 41% των εκπομπών CO<sub>2</sub> που σχετίζεται με την ανθρωπογενή δραστηριότητα προέρχεται από τον τομέα της ενέργειας. Οι τρεις κύριες πηγές τέτοιων εκπομπών είναι ο ορυκτός άνθρακας, το πετρέλαιο και το φυσικό αέριο, με τις δύο πρώτες να αντιπροσωπεύουν περίπου το 73% του συνόλου, ενώ η χρήση τους αναμένεται να αυξηθεί κατά 2% ανά έτος μέχρι το 2030.

Επί του παρόντος, ο Οργανισμός Ηνωμένων Εθνών έχει θεσπίσει 17 “Στόχους Βιώσιμης Ανάπτυξης” (Sustainable Development Goals) (United Nations, 2016), με κράτη και οργανισμούς σε όλο τον κόσμο να επιδιώκουν πολιτικές και στρατηγικές προς αυτή την κατεύθυνση. Η Ευρωπαϊκή Ένωση αναθεώρησε τη στρατηγική της για τη βιο-οικονομία το 2018 για να δώσει μεγαλύτερη έμφαση στους τρεις πυλώνες της βιωσιμότητας “οικονομία, κοινωνία και περιβάλλον” και να ευθυγραμμιστεί με τους στόχους του ΟΗΕ (European Commission, 2018). Η αξιολόγηση από τη Διακυβερνητική Επιτροπή για την Κλιματική Αλλαγή (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) συνιστά από το 2018 τον περιορισμό της ποσότητας συσσωρευμένων εκπομπών σε 750 Gt CO<sub>2</sub> μέχρι τα μέσα του αιώνα με σκοπό την επίτευξη μηδενικών παγκόσμιων εκπομπών. Η εφαρμογή αυτής της στρατηγικής συνεπάγεται την ουδετερότητα άνθρακα σε 35 χρόνια και απαιτεί άμεσα τη δράση από την πλευρά της παγκόσμιας κοινότητας (Gür, 2022). Οι πρόσφατες εκθέσεις της IPCC (2018) και η έκθεση του ΟΗΕ (2019) για τις εκπομπές αερίων ζητούν τη μείωση κατά 55% των εκπομπών CO<sub>2</sub> έως το 2030 σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές του 1990 προκειμένου να περιοριστεί η αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη κάτω

από 1,5°C σε αυτό το διάστημα. Οι εκθέσεις προτρέπουν επίσης τον ταχύ μετασχηματισμό των παγκόσμιων ενεργειακών συστημάτων από ορυκτά καύσιμα σε ανανεώσιμα ώστε να επιτευχθούν μηδενικές εκπομπές έως τα μέσα του αιώνα.



**Εικόνα 1. Παγκόσμιες εκπομπές CO<sub>2</sub> από τη χρήση ορυκτών καυσίμων και τη βιομηχανία και Ακαθάριστο Παγκόσμιο Προϊόν (\$US) εκφραζόμενο ως ισοτιμία αγοραστικής δύναμης (World Bank, 2018) από το 1990.**

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και ταυτόχρονα να διατηρηθεί η παγκόσμια οικονομική ανάπτυξη, απαιτείται η χρήση εναλλακτικών πρώτων υλών ως λύση για τη μείωση της χρήσης των ορυκτών καυσίμων. Αυτό εμπεριέχει την εφαρμογή ανανεώσιμων πηγών ενέργειας με μηδενικό αποτύπωμα άνθρακα στις διαδικασίες παραγωγής ώστε να γίνει η μετάβαση στην κυκλική οικονομία (Mohan et al., 2016).

### **1.1 Αξιοποίηση ανανεώσιμων πηγών άνθρακα**

Τα τελευταία χρόνια, η επεξεργασία της βιομάζας αποτέλεσε κύριο στόχο για την παραγωγή προϊόντων βιογενούς προέλευσης με εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, στη βιοενέργεια και στην παραγωγή χημικών και βιοπολυμερών (De Jong & Jungmeier, 2015). Η αναγκαιότητα αντικατάστασης των πετροχημικών με ενώσεις φιλικές προς το περιβάλλον, έχει στρέψει την προσοχή των ερευνητών στην βιοτεχνολογική παραγωγή τέτοιων προϊόντων. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να αξιοποιήσουν απόβλητα των βιομηχανικών διεργασιών και να διασφαλίσουν επίσης

υψηλότερη αποδοτικότητα και ελάχιστη παραγωγή παραπροϊόντων (Xue et al., 2018). Ωστόσο, η τρέχουσα βιομηχανική παραγωγή δεν είναι ακόμη οικονομικά ανταγωνιστική λόγω της χαμηλής παραγωγικότητας ορισμένων μικροοργανισμών, σε συνδυασμό με το υψηλό κόστος που σχετίζεται με τη διεργασία των βιομηχανικών ζυμώσεων. Οι πρόσφατες έρευνες επικεντρώνονται στην προσπάθεια να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, τόσο με την αναζήτηση νέων μικροβιακών στελεχών με αποδοτικότερη παραγωγή σε τελικά προϊόντα όσο και με τη χρήση εναλλακτικών υποστρωμάτων χαμηλού κόστους, αυξάνοντας το εμπορικό δυναμικό της παραγωγής (Bettencourt et al., 2020).

Οι βιομηχανικές ζυμώσεις απαιτούν τη χρήση πρώτων υλών που να είναι εύκολα διαθέσιμες αλλά ταυτόχρονα να πληρούν τις ειδικές απαιτήσεις των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται. Μια ευρεία ποικιλία διαφορετικών πηγών άνθρακα από υδατάνθρακες, τριγλυκερίδια, αλκοόλες και υδρογονάνθρακες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανική βιοτεχνολογία ωστόσο οι περισσότερες βιοτεχνολογικές διεργασίες βασίζονται επί του παρόντος στη βιομετατροπή υποστρωμάτων υδατανθράκων όπως η γλυκόζη (Wendisch et al., 2016). Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για τη λήψη αυτών των πηγών άνθρακα είναι φυτά που περιέχουν άμυλο ή σακχαρόζη, όπου με την υδρόλυση αυτών λαμβάνονται τα επιθυμητά υποστρώματα. Έτσι, έχοντας υπόψη τον αυξανόμενο παγκόσμιο πληθυσμό και την ενδεχόμενη επισιτιστική κρίση, οι εφαρμογές αυτών των πρώτων υλών για αντικατάσταση των πετροχημικών ανταγωνίζονται τις βιομηχανίες τροφίμων με αποτέλεσμα την αύξηση των τιμών των τροφίμων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση (Kumar & Park, 2018). Συνεπώς, η αποτελεσματική αντικατάσταση πρώτων υλών που θα έχουν μικρότερο κόστος χωρίς να ανταγωνίζονται τις εδωδιμες πρώτες ύλες και η μετατροπή τους σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας θα αποτελέσει μια σημαντική λύση στο εγγύς μέλλον.

### **1.1.1 Οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα**

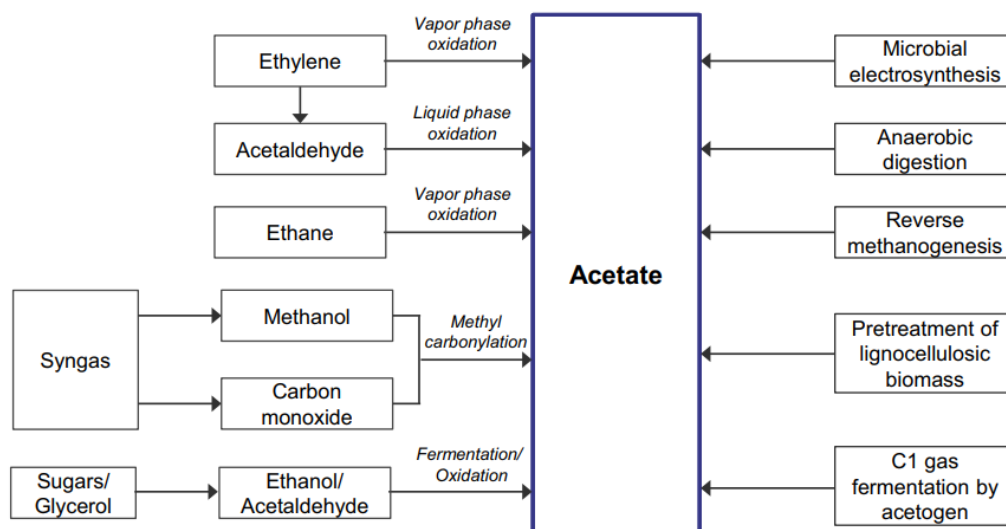
Ένα κύριο προϊόν ή υποπροϊόν που προκύπτει από διάφορες τεχνολογίες που αξιοποιούν αυτές τις πηγές είναι το οξικό ή αιθανοϊκό οξύ ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Είναι το δεύτερο πιο απλό καρβοξυλικό οξύ της ομάδας των οργανικών οξέων και αντιπροσωπεύει μια χημική ένωση με παγκόσμια οικονομική σημασία στη χημική βιομηχανία. Το μεγαλύτερο ποσοστό του σχετίζεται με τη μετατροπή του σε διάφορα

πολυμερή υλικά και παράγωγα συμπεριλαμβανομένων του μονομερούς οξικού βινυλίου (VAM), του οξικού ανυδρίτη, των οξικών εστέρων, καθώς και με τη χρήση του ως διαλύτη στη σύνθεση τερεφθαλικού οξέος, που αποτελεί πρώτη ύλη για την παραγωγή τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET) (Gahleitner & Paulik, 2014). Επιπλέον, το οξικό οξύ χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο (E260). Η παγκόσμια παραγωγή ανέρχεται σε 17,3 εκατομμύρια τόνους με αξία 8,6 δις. \$ το 2019 και αναμένεται να φτάσει περίπου τους 24,5 εκατομμύρια τόνους με αξία 12 δις. \$ έως το 2025. Η τιμή του κυμαίνεται μεταξύ 300 - 450 \$ ανά τόνο, η οποία είναι φθηνότερη από τα συμβατικά σάκχαρα όπως η γλυκόζη, που κοστίζει 500 \$ ανά τόνο (Keifer et al., 2021; Li et al., 2016; Lim et al., 2018).

### 1.1.2 Βιομηχανική παραγωγή οξικού οξέος

Το οξικό οξύ παράγεται χρησιμοποιώντας τόσο χημικές όσο και βιολογικές μεθόδους (Εικόνα 2). Το μεγαλύτερο μέρος του συντίθεται από πρώτες ύλες που προέρχονται από πετροχημικά όπως μεθανόλη, ακεταλδεΐδη, *n*-βουτάνιο ή αιθυλένιο (Pal & Nayak, 2017). Η σύνθεση πραγματοποιείται μέσω καρβονυλίωσης της μεθανόλης, οξείδωσης του αιθυλενίου ή οξείδωσης αλκανίων, με την πρώτη να αντιπροσωπεύει περίπου το 75% της συνολικής παραγωγής. Αντίθετα, η βιοτεχνολογική παραγωγή αντιπροσωπεύει μόνο το 10% περίπου και χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή ξυδιού, καθώς η νομοθεσία τροφίμων απαιτεί την βιολογική του προέλευση (Xu et al., 2011; Kim et al., 2021). Για την παραγωγή του διενεργείται διαδικασία ζύμωσης δύο σταδίων, η οποία περιλαμβάνει μια αλκοολική ζύμωση σακχάρων από ζύμες ακολουθούμενη από ατελή οξείδωση της αιθανόλης από βακτήρια οξικού οξέος (acetic acid bacteria) (Raspor & Goranovič, 2008).

Παρόλο που οι παραδοσιακές μέθοδοι εξακολουθούν να εφαρμόζονται για την παραγωγή ξυδιού, το μεγαλύτερο μέρος του παρασκευάζεται με ζύμωση σε αεριζόμενες ανοξείδωτες δεξαμενές. Ενώ οι συνήθεις τρόποι παραγωγής αποδίδουν συνήθως έως και 150 g/L οξικού οξέος, ορισμένες τροποποιημένες στρατηγικές δύνανται να αποδώσουν ακόμη και 200 g/L (Vidra & Németh, 2018). Η παραγωγή καθαρού οξικού οξέος από βιοαιθανόλη έχει επίσης αποκτήσει αυξανόμενη σημασία τα τελευταία χρόνια και οι εταιρείες Sekab AB (Domsjö, Sweden) και Wacker Chemie AG (Munche, Germany) αναφέρεται ότι παράγουν οξικό οξύ βιολογικής προέλευσης, αν και σε σχετικά μικρές ποσότητες (Kim et al., 2021).



**Εικόνα 2. Χημικές και βιολογικές μέθοδοι παραγωγής οξικού οξέος (Kim et al., 2021)**

Εκτός από τη βιομηχανική παραγωγή μεγάλης κλίμακας, υπάρχουν πολλές εναλλακτικές οδοί που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή οξικού οξέος σε σημαντικές ποσότητες από ανανεώσιμες πηγές. Πέραν της χρήσης ορυκτών πόρων, η αναερόβια χώνευση έχει αποδειχθεί ως μια επιτυχημένη και βιώσιμη μέθοδος για την ανάκτηση ανανεώσιμης ενέργειας χρησιμοποιώντας μια ποικιλία οργανικών ρευμάτων ως υπόστρωμα, όπως βιομηχανικά και γεωργικά απόβλητα (Li et al., 2019). Κατά τη διαδικασία αυτή, πολύπλοκα μακρομόρια αποικοδομούνται σε απλούστερες διαλυτές οργανικές ενώσεις, μέσω ενζύμων που εκκρίνονται από ορισμένους αναερόβιους μικροοργανισμούς. Στη συνέχεια, οι ενώσεις αυτές μετατρέπονται σε πτητικά λιπαρά οξέα όπως οξικό, προπιονικό, βουτυρικό και άλλα οξέα, καθιστώντας έτσι τα προϊόντα ως ένα μείγμα οργανικών οξέων (D’Silva et al., 2021; Rasapoor et al., 2020). Βέβαια, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφορα ζητήματα όπως η παραγωγή ενός μείγματος διάφορων οργανικών οξέων βραχείας αλυσίδας κατά τη διάρκεια της διεργασίας, καθώς και η διερεύνηση της μεμονωμένης τοξικότητας για κάθε οξύ όταν χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα. Επίσης, ο ρυθμός παραγωγής οξικού είναι σχετικά μικρός και η διαδικασία συμβαίνει συνήθως ταυτόχρονα με τη μεθανογένεση, με αποτέλεσμα τη δυσκολία συλλογής του (Gong et al., 2022).

Η προεπεξεργασία της βιομάζας μπορεί να οδηγήσει επίσης στην απελευθέρωση οξικού οξέος με την μορφή παραπροϊόντος. Λόγω της συμπαγούς

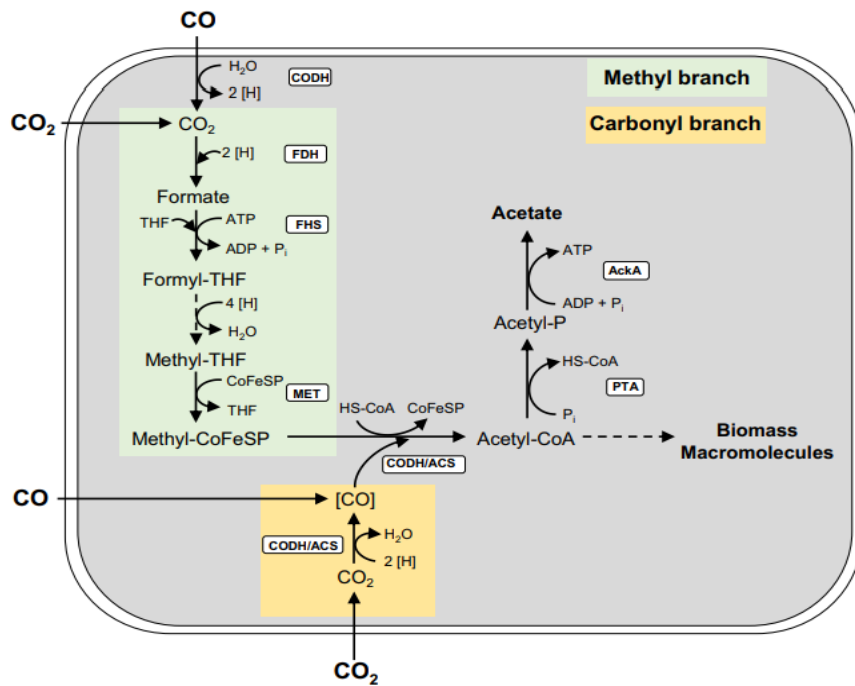


δομής της και της ανθεκτικότητάς της στη βιοαποικοδόμηση, η προεπεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας είναι συνήθως απαραίτητη για να αναδιαταχτεί η κρυσταλλική της δομή ενώ, εξαιρετικά αυστηρές συνθήκες προεπεξεργασίας (υψηλές θερμοκρασίες, όξινες ή αλκαλικές) μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή οξικού οξέος (Dahmen et al., 2019; Novak, K. & Pflügl, 2018). Τέτοιου είδους πρώτες ύλες μπορούν να ληφθούν σε μεγάλες ποσότητες από γεωργικά παραπροϊόντα που δεν ανταγωνίζονται τη βιομηχανία τροφίμων και ζωοτροφών, και θεωρείται ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική για πιθανή αντικατάσταση των πετροχημικών διυλιστηρίων με βιοδιυλιστήρια (Cherubini, 2010).

### ***1.1.2.1 Χρήση ρύπων προς παραγωγή οξικού οξέος***

Μια επιπλέον εναλλακτική βασίζεται στη μετατροπή των αερίων ενός ατόμου άνθρακα (C1), που είναι ενώσεις ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μετατροπή τους σε υψηλής αξίας προϊόντα στο πλαίσιο μιας μελλοντικής βιομηχανίας. Τα αέρια αυτά, όπως το μονοξείδιο του άνθρακα (CO), το διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>), το μεθάνιο (CH<sub>4</sub>) και το υδρογόνο (H<sub>2</sub>) αποτελούν υψηλής διαθεσιμότητας και χαμηλού κόστους πρώτες ύλες για παραγωγή οξικού οξέος μέσω διάφορων βιομηχανικών ρευμάτων. Αυτή η στρατηγική θεωρείται ιδιαίτερα καινοτόμα, καθώς η δέσμευση βιομηχανικών αποβλήτων και αερίων του θερμοκηπίου συμβάλει ταυτόχρονα στη δραστική μείωση τους από το περιβάλλον (Kiefer et al., 2021).

Μια ομάδα αναερόβιων βακτηρίων (acetogenes) είναι ικανά να καταναλώνουν τέτοιου είδους υποστρώματα άνθρακα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή οξικού αλλά και άλλων διαφορετικών χημικών ενώσεων όπως αιθανόλη, 2,3-βουτανοδιόλη και βουτανόλη (Schiel-Bengelsdorf & Durre, 2012; Valgepea et al., 2018; Kopke et al., 2011; Liou et al., 2005). Τα βακτήρια αυτά μέσω της μεταβολικής οδού Wood-Ljungdahl είναι ικανά να αναπτύσσονται χημειολιθοαυτοτροφικά και να μετατρέπουν μίγματα αερίων που περιέχουν CO ή CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>, όπως το συνθετικό αέριο (syngas) (Kantzow, et al., 2015). Η κεντρική μεταβολική οδός για τη δέσμευση CO ή CO<sub>2</sub> είναι η αναγωγική οδός ακέτυλο-CoA (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3. Μεταβολικό μονοπάτι Wood-Ljungdahl ανάπτυξης βακτηρίων σε μίγματα αερίων που περιέχουν CO ή CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (Kiefer et al., 2021)**

Η οδός αποτελείται από ένα μονοπάτι μεθυλίου και ένα μονοπάτι καρβονυλίου, που χρησιμεύουν για το σχηματισμό του κεντρικού μεταβολικού ενδιάμεσου ακετύλο-CoA. Στο πρώτο μονοπάτι, το CO ή το CO<sub>2</sub> ανάγεται σταδιακά σε μια ομάδα μεθυλίου ενώ στο δεύτερο, ένα άλλο μόριο CO<sub>2</sub> ανάγεται σε CO, το οποίο στη συνέχεια συμπυκνώνεται με τη μεθυλική ομάδα και το συνένζυμο A στο σύμπλοκο ενζύμου αφυδρογονάση μονοξειδίου του άνθρακα/συνθετάση ακετύλο-CoA (CODH/ACS) με αποτέλεσμα την παραγωγή ακετύλο-CoA. Τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την αναγωγή του CO<sub>2</sub> διατηρούνται με τη μορφή ανηγμένης φερρεδοξίνης και προέρχονται είτε από H<sub>2</sub>, το οποίο λειτουργεί ως δότης και ενεργοποιείται από υδρογονάσες (H<sub>2</sub>→2H<sup>+</sup>+2e<sup>-</sup>), είτε από CO, το οποίο ανάγεται σε CO<sub>2</sub> από το CODH που καταλύει την αντίδραση μετατόπισης νερού-αερίου (CO+H<sub>2</sub>O→CO<sub>2</sub>+2H<sup>+</sup>+2e<sup>-</sup>). Γενικά, η πλειονότητα των βακτηρίων αυτών παράγει οξικό οξύ ως μοναδικό μεταβολικό τελικό προϊόν κατά τη ζύμωση αερίων που περιέχουν CO ή CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> καθώς η μετατροπή του ακετύλο-CoA σε οξικό αποδίδει το ATP που απαιτείται στον κλάδο του μεθυλίου (Ragsdale & Pierce, 2008).

Οι Kantzow et al. (2013) και οι Straub et al. (2014) έχουν αναφέρει την παραγωγή 59,2 g/L και 51 g/L οξικού οξέος αντίστοιχα κατά τη διάρκεια ζύμωσης από διαφορετικά στελέχη του *Acetobacterium woodii* χρησιμοποιώντας ένα μείγμα αερίων CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>. Σημαντική πρόοδος επίσης έχει ήδη επιτευχθεί σε διεργασίες δύο σταδίων, στις οποίες το οξικό οξύ που παράγεται από βακτήρια σε αναερόβιες ζυμώσεις μετατρέπεται μέσω μικροοργανισμών σε τελικά προϊόντα βιολογικής προέλευσης όπως μικροβιακά λιπίδια (Hu et al., 2016; Robles-Iglesias et al., 2021), μηλικό οξύ (Oswald et al., 2016) και πολύ-υδρόξυ-αλκανοϊκούς εστέρες (Al Rowaihi et al., 2018).

Μία τεχνολογία που αποσκοπεί στη μετατροπή του CO<sub>2</sub> σε πιο πολύπλοκες χημικές ενώσεις είναι η μικροβιακή ηλεκτροσύνθεση. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των μικροοργανισμών να αποθηκεύουν ταυτόχρονα πλεονάζουσα ηλεκτρική ενέργεια με τη μορφή ομοιοπολικών χημικών δεσμών από πολυανθρακικές ενώσεις. Γενικά, έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο καθαρές όσο και μικτές μικροβιακές καλλιέργειες βακτηρίων, εκ των οποίων οι μικτές είναι αποδοτικότερες και εμφανίζουν υψηλότερους ρυθμούς παραγωγής οξικού οξέος. Οι Marshall et al. (2013) εφαρμόζοντας αυτή την τεχνολογία παράγααν 10,5 g/L οξικό οξύ με μέγιστο ρυθμό 1,04 g/L/ημέρα και οι Gildemyn et al. (2015) πέτυχαν παραγωγή 13,5 g/L οξικού οξέος. Παρόλα αυτά, προκειμένου τα εν λόγω εγχειρήματα μεγάλης κλίμακας να καταστούν βιώσιμα είναι απαραίτητο να επιτευχθούν υψηλότερες παραγωγικότητες, καθώς τα τρέχοντα κόστη παραγωγής και επένδυσης έχουν εκτιμηθεί ως υψηλά (Christodoulou & Velasquez-Orta, 2016). Τεχνολογικές προκλήσεις όπως η ανάπτυξη ηλεκτροδίων με υψηλότερη ηλεκτρική αγωγιμότητα, ισχυρότερη χημική σταθερότητα και μεγαλύτερες επιφάνειες απαιτούνται για να καταστεί η διεργασία οικονομικά και εμπορικά βιώσιμη για την παραγωγή οξικού οξέος από αέρια C1.

### **1.1.3 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση οξικού οξέος**

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στη βιοτεχνολογική μετατροπή του οξικού οξέος σε βιογενείς χημικές ενώσεις καθώς μπορεί να αξιοποιηθεί από μικροοργανισμούς για παραγωγή ποικίλων προϊόντων βιολογικής προέλευσης (Kiefer et al., 2021). Αυτό συμβαίνει διότι το οξικό οξύ έχει πολλά πλεονεκτήματα ως υπόστρωμα. Πρώτον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί από διάφορους μικροοργανισμούς ως μοναδική πηγή άνθρακα με τα αποδιδόμενα ακέτυλο-CoA και

τα ενδιάμεσα οξέα του κύκλου γλυοξυλικού/τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) να αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για την παραγωγή αρκετών προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Δεύτερον, είναι πλήρως αναμίξιμο με το νερό και η μεταφορά μάζας στο μέσο της καλλιέργειας δεν είναι περιοριστικός παράγοντας στις μικροβιακές ζυμώσεις. Τρίτον, σε σύγκριση με τις πηγές άνθρακα με βάση τα σάκχαρα, το οξικό είναι μια μη αναγωγική ένωση, επομένως δεν συμβάλλει στις αντιδράσεις μη ενζυμικής αμαύρωσης (Maillard) κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης ή της ζύμωσης. Τέταρτον, λόγω της οξειδωμένης φύσης του, οι οξειδωμένοι μεταβολίτες μπορούν να παραχθούν εύκολα χωρίς τη διάθεση πλεονάζουσας αναγωγικής ισχύος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δεξαμενή ηλεκτρονίων (Kim et al., 2021).

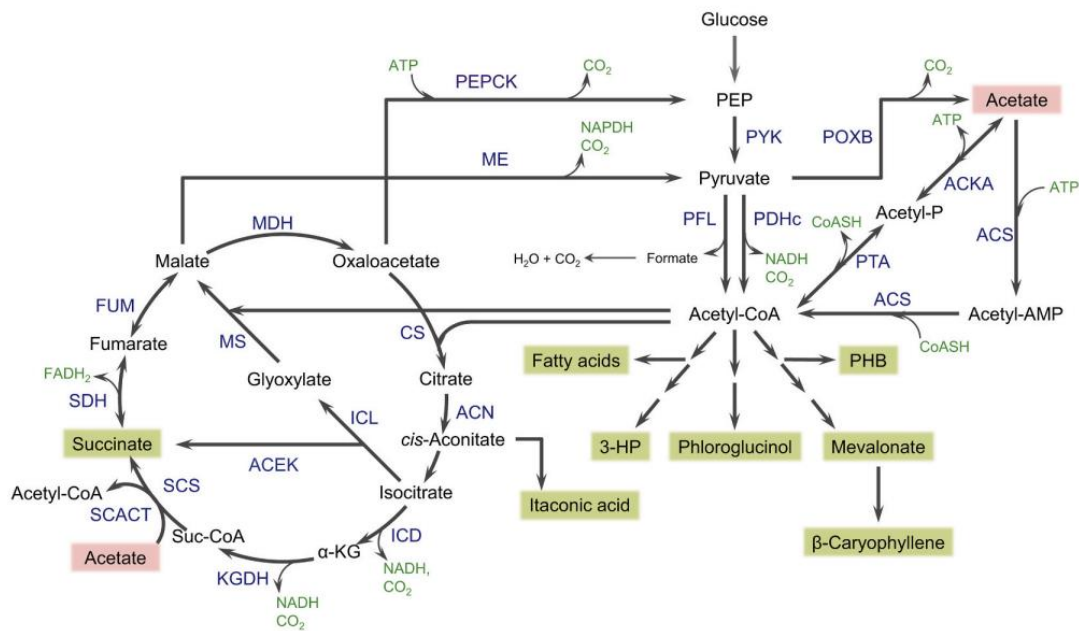
### ***1.1.3.1 Βιοχημεία μικροβιακού μεταβολισμού***

Το οξικό οξύ μεταφέρεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης κυρίως με ενεργή αλλά και με παθητική μεταφορά. Κατά την παθητική μεταφορά, η αδιάστατη μορφή οξικού οξέος εισέρχεται στο κύτταρο μέσω πόρων της εξωτερικής μεμβράνης με τη βοήθεια πρωτεϊνών που διευκολύνουν τη μεταφορά. Η παθητική μεταφορά οργανικών οξέων χαμηλού μοριακού βάρους ορίζεται από τη συγκέντρωση κατά μήκος της μεμβράνης και ο ρυθμός διάχυσης αυξάνεται όταν αυξάνεται η αναλογία “ελεύθερο οξύ:ανιόν” μέσω της μείωσης του pH του μέσου. Στο εσωτερικό του κυττάρου, το οξικό οξύ διασπάται γρήγορα σε ένα οξικό ανιόν ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) και ένα πρωτόνιο ( $\text{H}^+$ ) και το ανιόν συνήθως δεν επιστρέφει στο περιβάλλον. Κατά τη διάρκεια της ενεργού μεταφοράς, το ανιόν μεταφέρεται από συμφορείς, οι οποίοι ενεργοποιούνται από  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+$ :διαλυμένη ουσία) ή  $\text{H}^+$  ( $\text{H}^+$ :μονοκαρβοξυλικό ιόν). Ο συμφορέας  $\text{Na}^+$ :διαλυμένης ουσίας είναι συχνά υπεύθυνος για την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών όπως σάκχαρα, αμινοξέα, νουκλεοτίδια κ.α. (Reizer et al., 1994; Saier Jr., 2000).

Το πρώτο στάδιο για την αξιοποίηση του οξικού οξέος είναι η μετατροπή του σε ακετύλο-CoA (Εικόνα 4). Η πραγματοποίησή της γίνεται μέσω των οδών της οξικής κινάσης-φωσφοτρανσκετυλάσης (ACKA-PTA) και/ή της συνθετάσης ακετύλο-CoA (ACS). Η οδός ACKA-PTA είναι αντιστρέψιμη, επιτρέποντας την αμφίδρομη μετατροπή μεταξύ οξικού και ακετύλο-CoA, ενώ η οδός ACS είναι μη αντιστρέψιμη, περιλαμβάνοντας το ένζυμο ακετύλο-AMP ως ενδιάμεσο. Παρότι και στις δύο οδούς καταναλώνεται ένα μόριο ATP για τη μετατροπή, στην οδό ACS

ξοδεύεται περισσότερη ενέργεια καθώς το πυροφωσφορικό (PPi) που σχηματίζεται μαζί με το ακέτυλο-AMP χωρίζεται περαιτέρω σε δύο Pi (Lin et al., 2006). Στην οδό ACKA-PTA, η φωσφορική ομάδα του ATP μεταφέρεται αντιστρέψιμα στο οξικό για να σχηματίσει ακέτυλο-Pi και ADP. Στη συνέχεια, το ένζυμο PTA συμμετέχει στην μετατροπή των ακέτυλο-Pi και CoA-SH σε ακέτυλο-CoA με την απελευθέρωση ενός μορίου φωσφορικού (Dittrich et al., 2005; Shi et al., 2005). Ομοίως, η μετατροπή του οξικού σε ακέτυλο-CoA από τη συνθετάση ακέτυλο-CoA γίνεται σε δύο στάδια, αλλά χωρίς ακέτυλο-Pi ως ενδιάμεσο. Στο πρώτο βήμα, παράγεται ακέτυλο-AMP ως ενδιάμεσο από οξικό και ATP, με την απελευθέρωση ενός μορίου PPi. Στο δεύτερο στάδιο, το σύμπλοκο ακέτυλο-AMP/ενζύμου αντιδρά με το CoA για να παράγει ακέτυλο-CoA και AMP (Jogl & Tong, 2004).

Η αφομοίωση του οξικού οξέος λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω της διακλάδωσης του γλυοξυλικού και σπανιότερα μέσω της οδού αιθυλομαλονύλ-CoA και του κύκλου του μεθυλο-ασπαρτικού (Dolan & Welch, 2018). Και οι τρεις οδοί είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των κυττάρων σε υποστρώματα που ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούνται ενώσεις C1 ή C2, προκειμένου το ακέτυλο-CoA, μια ένωση C2 να μετατραπεί σε μια ένωση C4 και να λάβει μέρος στις μεταβολικές διεργασίες της βιοσύνθεσης. Η διακλάδωση του γλυοξυλικού είναι η απλούστερη από τις τρεις και αποτελεί μια τροποποιημένη έκδοση του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) κατά την οποία παρακάμπτονται τα βήματα του κύκλου που οδηγούν σε απώλεια CO<sub>2</sub>. Μέσω αυτού του τροποποιημένου κύκλου παρακάμπτονται τα δύο αυτά στάδια με τη συνδυαστική δράση των ενζύμων ισοκιτρική λυάση (ICL) και μηλική συνθάση (MS). Ένα μέρος της ροής άνθρακα εκτρέπεται στο επίπεδο του ισοκιτρικού για να αποτραπεί η απώλεια άνθρακα με τη μορφή CO<sub>2</sub> και να επιτραπεί ο σχηματισμός συνθετικών προδρόμων μορίων C4. Τελικώς αποδίδεται ένα μόριο ηλεκτρικού οξέος ανά κύκλο, το οποίο μπορεί περαιτέρω να μετατραπεί σε οξαλοξικό, χρησιμεύοντας ως πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση αμινοξέων ή να χρησιμοποιηθεί μέσω της οδού της γλυκονεογένεσης (Borjian et al., 2016).



**Εικόνα 4. Κύρια μεταβολικά μονοπάτια για μετατροπή οξικού οξέος σε υψηλής αξίας τελικά προϊόντα (Kim et al., 2021)**

### 1.1.3.2 Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας

Η βιοτεχνολογική μετατροπή του οξικού οξέος σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας απαιτεί τη χρήση μικροοργανισμών ικανών να αναπτυχθούν σε οξικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα, με παραμέτρους απόδοσης συγκρίσιμες με εκείνες των κοινώς χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων. Τα προϊόντα ταξινομούνται ανάλογα με το αν είναι άμεσα ενδιάμεσα ή παράγωγα της παράκαμψης του γλυοξυλικού του κύκλου TCA, δηλαδή προερχόμενα από ακετύλιο-CoA, και με βάση την εισαγωγή των συνθετικών μεταβολικών οδών (Kim et al., 2021).

Το οξικό οξύ έχει βρει εφαρμογή για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση 1,4-βουτανοδιόλης, τετραϋδροφουράνιου, γ-βουτυρολακτόνης και μονομερών βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών (Cheng et al., 2012). Οι Li et al. (2016) μελέτησαν εκτενώς την παραγωγή ηλεκτρικού από οξικό χρησιμοποιώντας το στέλεχος *E. coli* MG1655, τροποποιώντας τον κύκλο των TCA μέσω της παράκαμψης του γλυοξυλικού και την εκτροπή της ροής άνθρακα προς το ηλεκτρικό.

Το ιτακονικό οξύ, ένα ακόρεστο δικαρβοξυλικό οξύ, παράγεται μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του ακονιτικού οξέος από το ένζυμο *cis*-αποκαρβοξυλάση του

ακονιτικού (CAD), που είναι ένα ενδιάμεσο του κύκλου TCA και προκύπτει όταν το κίτρινο μετατρέπεται σε ισοκίτρινο από το ένζυμο ακονιτάση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δομικό στοιχείο για ίνες, ρητίνες, πλέγματα, πλαστικά, απορρυπαντικά, καουτσούκ, βαφές, επιφανειοδραστικές ουσίες και λιπαντικά. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πολλών άλλων χημικών ενώσεων που προέρχονται επί του παρόντος από πετροχημικά (Bafana & Pandey, 2018; Steiger et al., 2013). Οι Kuenz et al. (2012) μελέτησαν τον *Aspergillus terreus* για παραγωγή ιτακονικού με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα με παραγωγή μεγαλύτερη των 80 g/L. Παρόμοια με το ηλεκτρικό οξύ, το ιτακονικό είναι κατάλληλο για παραγωγή από οξικό, κάτι που μελετήθηκε από τους Noh et al. (2018) με τη χρήση του *E. coli.*, αλλά η απόδοση ήταν χαμηλή σε σύγκριση με τις τιμές που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας το *A. terreus* που αναπτύχθηκε σε γλυκόζη. Επίσης, το μηλικό οξύ ως ένα ενδιάμεσο του κύκλου TCA, παράγεται από τον *A. oryzae* DSM 1863 με οξικό οξύ ως υπόστρωμα, και μαζί με τα προαναφερθέντα προϊόντα, θεωρείται σημαντικό χημικό βιολογικής προέλευσης για την αντικατάσταση των πετροχημικών (Oswald et al., 2016; Kövilein et al., 2019).

Οι πολυ-υδρόξυ-αλκανοϊκοί εστέρες (PHAs) έχουν συγκεντρώσει μεγάλη προσοχή ως βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή με το πιο γνωστό να είναι το πολυμερές πολύ-3-υδρόξυ-βουτυρικό (PHB) (Philip et al., 2007). Το υψηλότερο κόστος παραγωγής του σε σύγκριση με αυτό των πλαστικών που προέρχονται από πετρέλαιο απαιτεί τη χρήση φθηνότερων υποστρωμάτων άνθρακα με αποτέλεσμα να έχει μελετηθεί η παραγωγή του από οξικό σε αρκετές μελέτες (Garcia-Gonzalez & De Wever, 2018; Chen et al. 2018; Yang et al., 2019). Επίσης, η εισαγωγή πλήρως ή μερικώς συνθετικών οδών στο *E. coli* επέτρεψε επιπλέον τη σύνθεση βιοπροϊόντων όπως ακετόνη, ισοβουτανόλη, ισοπροπανόλη, μεβαλονικό οξύ, 3-υδρόξυ-προπιονικό οξύ (3-HP) και β-καρυοφυλλένιο (Yang et al., 2019; Song et al., 2018; Yang, et al., 2020; Xu et al., 2018; Lee et al. 2018; Yang & Nie, 2016).

Η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων από οξικό οξύ έχει επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Η σύνθεση των λιπαρών οξέων των μικροβιακών λιπιδίων είναι συγκρίσιμη με εκείνη των φυτικών ελαίων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ και συνεπώς θεωρούνται μια πιθανή εναλλακτική για τη βιομηχανία παραγωγής ενέργειας (Christophe et al., 2012). Εκτός από το οξικό οξύ, και άλλα πτητικά λιπαρά οξέα όπως το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ έχουν χρησιμοποιηθεί

ως πρώτες ύλες χωρίς όμως να επιτυγχάνουν υψηλό ρυθμό παραγωγής. Τα πτητικά λιπαρά οξέα είναι γενικά τοξικά για τους μικροοργανισμούς σε σύσταση άνω των 5 g/L (Liu et al., 2016). Οι Fontanille et al. (2012) ανέπτυξαν ένα σύστημα ημισυνεχούς ζύμωσης δύο σταδίων χρησιμοποιώντας τη ζύμη *Yarrowia lipolytica*, όπου στο πρώτο στάδιο έγινε καλλιέργεια σε υψηλής πυκνότητας υπόστρωμα γλυκόζης/γλυκερόλης και στο δεύτερο στάδιο έγινε παραγωγή μικροβιακού λίπους από πτητικά λιπαρά οξέα. Τα αποτελέσματα έδειξαν 12-16 g/L λιπιδίων με περιεκτικότητα 38-40%. Οι Beligon et al. (2015) χρησιμοποιώντας την ελαιογόνο ζύμη *Cryptococcus curvatus* με οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα παράγααν λιπίδια σε συγκεντρώσεις της τάξης των 25 g/L.

Οι Hu et al. (2016) ανέπτυξαν επίσης μια ολοκληρωμένη διεργασία δύο σταδίων για την παραγωγή λιπιδίων. Στο πρώτο στάδιο, το αέριο σύνθεσης που προέρχεται από την αεριοποίηση άνθρακα/φυσικού αερίου/βιομάζας μετατράπηκε αναερόβια σε οξικό οξύ από το βακτήριο *Moorella thermoacetica*. Στο δεύτερο στάδιο, το παραγόμενο οξικό οξύ μετατράπηκε μέσω αερόβιας ζύμωσης σε μικροβιακά λιπίδια από στέλεχος *Y. lipolytica*. Αρχικά, στην αναερόβια ζύμωση πραγματοποιήθηκε η παραγωγή βιομάζας και στη συνέχεια χορηγήθηκαν H<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub> για την ενίσχυση της παραγωγής οξικού οξέος, η οποία είχε ως αποτέλεσμα 25 g/L οξικού (παραγωγικότητα 0,9 g/L/h). Στη συνέχεια, η υψηλότερη συγκέντρωση οξικού οξέος ορίστηκε κάτω από 25 g/L για την αποφυγή τοξικών επιδράσεων. Η χρήση του H<sub>2</sub> ως δότη ηλεκτρονίων περιόρισε την παραγωγή ATP στο *M. thermoacetica* με αποτέλεσμα να διοχετεύεται περισσότερο ακέτυλο-CoA προς το σχηματισμό οξικού οξέος και όχι βιομάζας. Έπειτα, το μέσο καλλιέργειας του πρώτου σταδίου λειτουργούσε ως τροφοδοσία για το δεύτερο στάδιο για την παραγωγή λιπιδίων. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, η ζύμη *Y. lipolytica* παράγαγε 18 g/L λιπιδίων με περιεκτικότητα 36%. Για την αύξηση της περιεκτικότητας των λιπιδίων, εφαρμόστηκε ανακύκλωση κυττάρων και επιτεύχθηκε συγκέντρωση λιπιδίων 46 g/L με περιεκτικότητα 59%. Η μελέτη αυτή καταδεικνύει μια ενδιαφέρουσα ολοκληρωμένη διαδικασία για την παραγωγή οξικού οξέος από αέρια C1 και την επακόλουθη μετατροπή τους σε μικροβιακό λίπος.



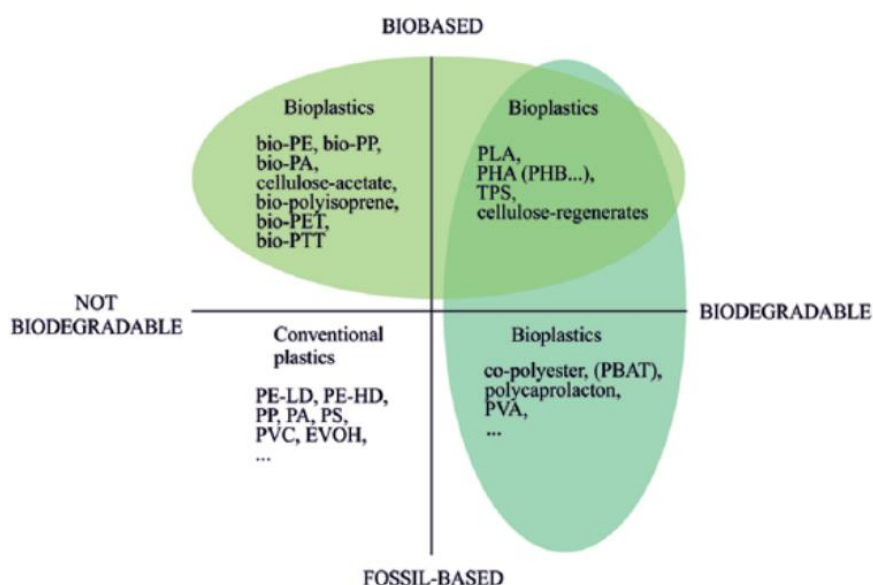
#### **1.1.4 Βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά**

Η παραγωγή θερμοπλαστικών πολυμερών έχει οδηγήσει σε πολλαπλά κοινωνικά και οικονομικά οφέλη. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1940, η παραγωγή τους παρουσιάζει ευρεία χρήση στο βιομηχανικό κλάδο και στην παραγωγή καταναλωτικών αγαθών εξαιτίας της πλαστικότητας, του χαμηλού κόστους παραγωγής και της μακράς διάρκειας αντοχής τους (Jacques & Prosser, 2021). Όμως, παρά τα πλεονεκτήματα της χρήσης τους, η μη αποικοδομησιμότητα και η έλλειψη τεχνολογιών διαχείρισης και ανακύκλωσης σε παγκόσμιο επίπεδο έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση τεράστιων ποσοτήτων πλαστικών στο περιβάλλον (Geyer et al., 2017).

Από το 1950, η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών έχει αυξηθεί από 2 σε 359 εκατομμύρια τόνους το 2019, με την συσσωρευμένη ποσότητα να αναμένεται να ανέλθει στους 26 δισεκατομμύρια τόνους έως το 2050 (Plastics Europe, 2019). Οι τρέχουσες πρακτικές διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων αφορούν την απόρριψη στο περιβάλλον ή σε χώρους υγειονομικής ταφής (79%), τη μετατροπή σε εκπομπές αερίων και ενέργειας μέσω αποτέφρωσης (12%) και την ανακύκλωση (9%) κυρίως μέσω θερμομηχανικών τεχνολογιών (Rosenboom et al., 2022). Η ανάπτυξη τεχνολογιών χημικής ανακύκλωσης παρέχει πολλά υποσχόμενες οδούς στο τέλος του κύκλου ζωής των πλαστικών όπως την ανάκτηση πολυμερών συσκευασίας με χρήση διαλυτών, τη μετατροπή πολυμερών σε μονομερή και δομικές ενώσεις μέσω υδρόλυσης και τη θερμοχημική μετατροπή σε καύσιμα μέσω πυρόλυσης (Lamberti et al., 2020). Η βιώσιμη παραγωγή πλαστικών μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών και ενέργειας σε συνδυασμό με την ανάπτυξη κυκλικών διεργασιών και εναλλακτικών πρακτικών ανακύκλωσης (Luyt & Malik, 2019).

Η βιοαποικοδομησιμότητα των πλαστικών εξαρτάται από τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τους, την χημική σύσταση και δομή των τελικών προϊόντων καθώς και από το περιβάλλον στο οποίο αυτά πρόκειται να αξιοποιηθούν από τους υπάρχοντες μικροοργανισμούς. Έτσι, ορισμένα πλαστικά παραγόμενα από ορυκτές πηγές μπορούν να χαρακτηριστούν ως βιοαποικοδομήσιμα εφόσον πληρούν ορισμένες από τις παραπάνω προϋποθέσεις. Επιπλέον, πλαστικά βιολογικής προέλευσης είναι πιθανό να στερούνται βιοαποικοδόμησης, παρότι οι πρώτες ύλες

παραγωγής τους προέρχονται από τη βιομάζα (Εικόνα 5) (Briassoulis & Dejean, 2010).



**Εικόνα 5. Συντεταγμένες βιοποικοδομησιμότητας και προέλευσης πλαστικών (European Bioplastics, 2011)**

Επί του παρόντος, η οργανική ανακύκλωση μέσω κομποστοποίησης και αναερόβιας χώνευσης αποτελούν διαθέσιμες επιλογές διαχείρισης βιοαποικοδομήσιμων υλικών. Στην περίπτωση της κομποστοποίησης, η παραγωγή μεθανίου και η ανάκτηση ενέργειας παρουσιάζεται ως μια βιώσιμη λύση μετατροπής της βιομάζας, καθώς το παραγόμενο βιοαέριο δεν προέρχεται από ορυκτές ύλες. Επίσης, μπορεί να χρησιμεύσει ως μια εναλλακτική για τη μη απόρριψη των οργανικών αποβλήτων σε χώρους υγειονομικής ταφής και την αποφυγή παραγωγής θερμότητας και εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου. Ωστόσο, μόνο μερικοί τύποι πλαστικών βιολογικής προέλευσης έχουν αποδειχθεί ότι βιοαποικοδομούνται επιτυχώς μέσω αυτών των οδών (Agarwal, 2020).

Η ανάπτυξη νέων βιοτεχνολογικών αλυσίδων αξιοποίησης αποβλήτων βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην ενζυμική ή/και μικροβιακή μετατροπή σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Η βιολογική ανακύκλωση βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών σε χημικά απαιτεί τον αποπολυμερισμό τους και την επακόλουθη χρήση τους ως πηγή άνθρακα. Ωστόσο, οι εφαρμογές βιολογικής ανακύκλωσης πλαστικών απορριμμάτων βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης και έρευνας (Wierckx et al., 2015).

Το γαλακτικό οξύ αποτελεί το μονομερές του πολύ-γαλακτικού οξέος (PLA), ενός από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα ανακυκλώσιμα πλαστικά. Το εν λόγω οξύ μπορεί να μετατραπεί σε πυροσταφυλικό με τη δράση του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), όπου απαντάται σε βακτήρια συμπεριλαμβανομένου του *E. coli* (Garvie, 1980), με μελέτες να έχουν αποδώσει ικανοποιητική αύξηση της βιομάζας (Hua et al., 2007) και παραγωγής οξικού και φορμικού οξέος (Yamamoto & Ishimoto, 1981). Το ηλεκτρικό οξύ και η 1,4-βουτανοδιόλη αποτελούν τα συστατικά μονομερή του βιοαποικοδομήσιμου ηλεκτρικού πολύ-βουτυλενίου (PBS), ενώ η 1,4-βουτανοδιόλη είναι επίσης ένα από τα τρία συστατικά μονομερή του πολυεστέρα τερεφθαλικό αδιπικό πολύ-βουτυλένιο (PBAT). Το ηλεκτρικό οξύ ως ενδιάμεσο του κύκλου TCA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα από το *E. coli* χωρίς να υποστεί γενετική τροποποίηση (Edwards et al., 2001). Ωστόσο, δεν υπάρχουν ενδείξεις για την ικανότητα του *E. coli* να αφομοιώνει την 1,4-βουτανοδιόλη. Επιπλέον, διάφορες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή PHAs από ενώσεις που προέρχονται από βιοπολυμερή. Οι Myung et al. (2014) παρήγαγαν PHB μέσω μικτών καλλιέργειών σε μείγματα μονομερών που προέρχονται από διαφορετικές μεθόδους αποικοδόμησης του PHB, με τη συσσώρευσή του στα κύτταρα να ανέρχεται στο 50% (w/w). Οι Samorì et al. (2022) πραγματοποίησαν αποπολυμερισμό του PHB σε κροτονικό οξύ μέσω απόσταξης, με το μονομερές να χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την εκ νέου παραγωγή PHB με τον μικροοργανισμό *C. necator*, καταγράφοντας απόδοση 0,60 g/g και περιεκτικότητα 63% (w/w). Επιπλέον, στη μελέτη των Zoghbi et al. (2023) πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες με το στέλεχος *P. sacchari* χρησιμοποιώντας εμπορικά οξέα που αποτελούν μονομερή του PHB, με την απόδοση να ανέρχεται σε 0,26 g/g.

Συμπερασματικά, η βιοτεχνολογική ανακύκλωση των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών μπορεί να προσφέρει πολλαπλά πλεονεκτήματα. Η βελτιστοποίηση των διαδικασιών αποπολυμερισμού και των βιομηχανικών ζυμώσεων μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη κυκλικών διεργασιών που θα μειώσουν τη χρήση ορυκτών πόρων για την παραγωγή πλαστικών, καθώς και να μειώσουν το περιβαλλοντικό αποτύπωμα των συμβατικών διεργασιών.

## 1.2 Λιπίδια

Τα λιπίδια αντιπροσωπεύουν μια μοναδική κατηγορία οργανικών ενώσεων, καθώς η δομή τους δεν καθορίζεται από την παρουσία ή όχι κάποιας συγκεκριμένης λειτουργικής ομάδας αλλά από τη διαλυτότητα. Συγκεκριμένα, πρόκειται για ενώσεις που απαντούν στη φύση και μπορούν να εκχυλιστούν από τα κύτταρα με τη χρήση άπολων οργανικών διαλυτών. Στην κατηγορία των λιπιδίων ανήκει ένας μεγάλος αριθμός βιολογικών ενώσεων και ταξινομούνται σε σύνθετα και απλά. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν αυτά που περιέχουν εστερικές ομάδες και μπορούν να υδρολυθούν σε υδατικά όξινα ή βασικά διαλύματα παράγοντας μικρότερα μόρια ενώ στη δεύτερη είναι τα λιπίδια που δεν περιέχουν εστερομάδες και δεν υδρολύονται. Οι τρεις μεγαλύτερες κατηγορίες των σύνθετων λιπιδίων είναι οι κηροί, τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιπίδια. Ακριβώς όπως τα σύνθετα, έτσι και τα απλά λιπίδια μπορούν να διακριθούν σε διάφορες κατηγορίες, όπου τρεις από αυτές είναι τα στεροειδή, οι προσταγλανδίνες και τα τερπένια (Klein, 2020).

### 1.2.1 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

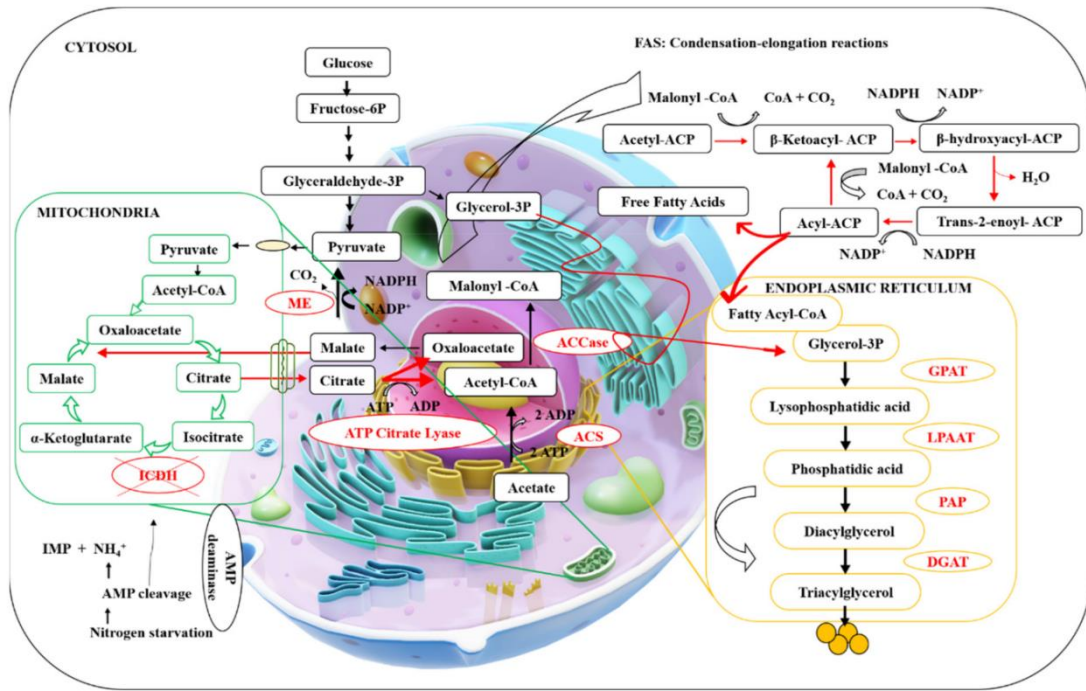
Ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν και να συσσωρεύουν λιπίδια (Single Cell Oil, SCO) σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% επί του ξηρού τους βάρους. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάζονται ελαιογόνοι και μπορεί να είναι βακτήρια, μύκητες, ζύμες, κυανοβακτήρια ή άλγη και η σύσταση του λίπους που συσσωρεύουν είναι παρόμοια με αυτή που απαντάται στα φυτά (Ratledge, 1994). Λιγότερα από 30 από τα περίπου 600 είδη ζυμών είναι γνωστά ως ελαιογόνα και απαντώνται τυπικά, αλλά όχι αποκλειστικά, σε γένη όπως *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Lipomyces* και *Yarrowia* (Ratledge & Tan 1990). Κατά κύριο λόγο, οι ζύμες αυτές συσσωρεύουν λιπίδια που αντιστοιχούν στο 40% της βιομάζας τους. Ωστόσο, υπό συνθήκες περιορισμού ορισμένων θρεπτικών συστατικών, μπορεί να συσσωρεύουν λιπίδια σε επίπεδα που υπερβαίνουν το 70%. Τα μικροβιακά λιπίδια αποτελούνται κατά 80-90% από τριακυλογλυκερόλες (TAG) και κατά ένα μικρό κλάσμα από στερυλεστέρες (SE) που ονομάζονται ουδέτερα λιπίδια. Αυτά τα αποθηκευτικά λιπίδια συσσωρεύονται σε εξειδικευμένα μέρη του κυττάρου γνωστά ως λιποσωμάτια (Lipidbody, LB). Τα λιποσωμάτια αποτελούνται από έναν πυρήνα λιπιδίου που περικλείεται σε μια μονοστιβάδα φωσφολιπιδίου εντός της οποίας είναι ενσωματωμένες πολλές πρωτεΐνες με διαφορετικές λειτουργίες

(Brown 2001; Fujimoto et al. 2008). Τα κύτταρα καθώς και αρκετές πρωτεΐνες των λιποσωματίων παίζουν βασικό ρόλο στην αποθήκευση λιπιδίων, τη βιοσύνθεση, το μεταβολισμό, την αποδόμηση και τη διακίνηση των υποστρωμάτων (Brown 2001; Beckman 2006). Επίσης, η περιεκτικότητα σε λιπίδια και το προφίλ των λιπαρών οξέων που συσσωρεύονται στα λιποσωμάτια διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών ειδών (Beopoulos, 2011).

### **1.2.2 Βιοχημεία σύνθεσης και συσσώρευσης μικροβιακών λιπιδίων**

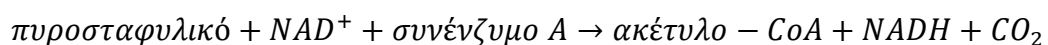
Κρίσιμης σημασίας για την περαιτέρω ανάπτυξη των διαδικασιών παραγωγής μικροβιακού λίπους, είναι η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι μικροοργανισμοί συνθέτουν και συσσωρεύουν τα λιπαρά οξέα. Συγκεκριμένα, δύο χαρακτηριστικά των ελαιογόνων ζυμών είναι η ικανότητα συνεχούς παροχής ακέτυλο-CoA απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ως απαραίτητο πρόδρομο μόριο για τη δράση της συνθετάσης λιπαρών οξέων (FAS) και η ικανότητα παροχής επαρκούς ποσότητας NADPH ως βασικό αναγωγικό μέσο για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004).

Όσον αφορά τη διαδικασία της σύνθεσης και συσσώρευσης των λιπιδίων αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους ανάλογα με το προς κατανάλωση υπόστρωμα. Η *ex novo* σύνθεση λιπαρών οξέων σχετίζεται με την ύπαρξη υδρόφοβων υποστρωμάτων και απαιτείται η υδρόλυσή τους ακολουθούμενη από την ενσωμάτωση και μεταφορά τους με τη μορφή CoA-SH με σκοπό την αποθήκευση ουδέτερων λιπιδίων. Η *de novo* σύνθεση προβλέπει τη σύνθεση των πρόδρομων ενώσεων των λιπαρών οξέων όπως το ακέτυλο-CoA και το μηλονύλο-CoA και την επακόλουθη επιμήκυνσή τους σε αλυσίδες C14-C16, ανάλογα με τα ένζυμα που διαθέτει κάθε μικροοργανισμός. Αυτά τα πρόδρομα μόρια τροφοδοτούνται στη συνέχεια για τη σύνθεση λιπιδίων, όπου με τη δράση ενζύμων σχηματίζουν τριακυλογλυκερόλες και στερυλεστέρες. Τα ουδέτερα λιπίδια αποθηκεύονται στη συνέχεια μέσα στα λιποσωμάτια και χρησιμεύουν ως αποθέματα ενέργειας (Beopoulos, 2011) (Εικόνα 6).

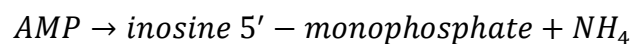


**Εικόνα 6. Βιοχημεία συσσώρευσης τριγλυκεριδίων (TAGs) σε ελαιογόνες ζύμες (Caporusso et al., 2021)**

Κατά την αφομοίωση της πηγής άνθρακα, το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης είναι το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο εισέρχεται εντός του μιτοχονδρίου. Το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε ακέτυλο-CoA μέσω κατάλυσης από το ένζυμο πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDC) και εισέρχεται στον κύκλο του Krebs σύμφωνα με την αντίδραση

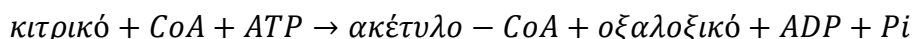


Όταν η πηγή αζώτου στο περιβάλλον ανάπτυξης εξαντληθεί, ο κύκλος του Krebs διακόπτεται και παρατηρείται ενεργοποίηση του ενζύμου AMP-απαμινάση το οποίο καταλύει την διάσπαση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) σε μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP) και ιόντα αμμωνίου ( $\text{NH}_4$ ) σύμφωνα με την αντίδραση



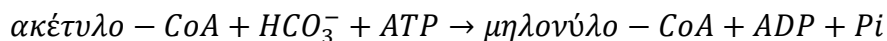
Η δραστηριότητα αυτού του ενζύμου κατά τον περιορισμό αζώτου στο μέσο της ανάπτυξης οδηγεί στην ταχεία πτώση της συγκέντρωσης AMP και τη μείωση της ενεργότητας του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH), το οποίο ενεργοποιεί αλλοστερικά. Η ισοκιτρική αφυδρογονάση είναι υπεύθυνη για την μετατροπή του

ισοκιτρικού οξέος σε α-κετογλουταρικό οξύ, το οποίο έχει ως συνέπεια την συσσώρευση του ισοκιτρικού οξέος εντός του μιτοχονδρίου. Το ισοκιτρικό οξύ μετατρέπεται σε κιτρικό οξύ μέσω κατάλυσης από το ένζυμο ισοκιτρική ακοτινάση και εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα μέσω του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος. Στη συνέχεια το κιτρικό οξύ μέσω του ενζύμου ATP-κιτρική λυάση (ACL) διασπάται σε ακέτυλο-CoA και οξαλοξικό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

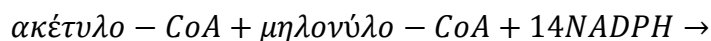


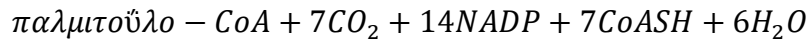
Ο σχηματισμός του ακέτυλο-CoA στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς έχει αποδοθεί στην παρουσία του ενζύμου ATP-κιτρική λυάση, το οποίο δεν φαίνεται να εμφανίζεται στην πλειονότητα των μη ελαιογόνων ειδών. Τελικώς, το ακέτυλο-CoA χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων ενώ το οξαλοξικό μετατρέπεται μέσω της μηλικής αφυδρογονάσης (MDH) και μεταφέρεται πίσω στα μιτοχόνδρια προκειμένου να κλείσει ο κύκλος του μεταφορέα κιτρικού-μηλικού (Ratledge, 2004).

Η πρώτη αντίδραση για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων μετά τη δημιουργία του ακέτυλο-CoA είναι η μετατροπή σε ακέτυλο-ACP, το οποίο συνδέεται με ένα ένζυμο συνθετάσης και καταλύει το επόμενο στάδιο της συμπύκνωσης. Στη συνέχεια, ένα άλλο μόριο ακέτυλο-CoA συμμετέχει σε αντίδραση καρβοξυλίωσης καταλυόμενο από το ένζυμο καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA (ACC) και μετατρέπεται σε μηλονύλο-CoA. Το ένζυμο είναι εξαρτώμενο από το συνένζυμο βιοτίνη και η συνολική αντίδραση δίδεται ως



Η αντίδραση αυτή θεωρείται το περιοριστικό στάδιο για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και ενεργοποιείται από την περίσσεια του κιτρικού οξέος στο κυτταρόπλασμα των ελαιογόνων μικροοργανισμών. Όταν επιτευχθεί η παραγωγή του μηλονύλο-CoA, η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων συνεχίζεται με τη συμβολή ενός πολλαπλού ενζυμικού συμπλέγματος το οποίο ονομάζεται συνθετάση των λιπαρών οξέων (FAS) με την συνολική αντίδραση να δίδεται ως





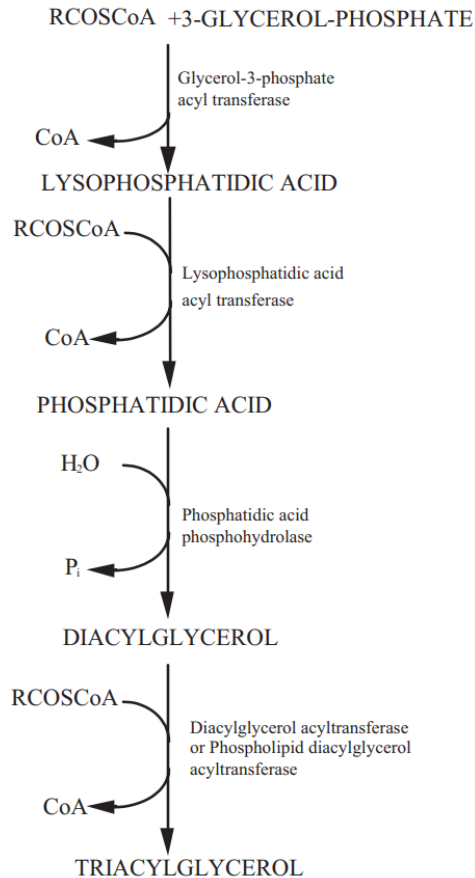
Συγκεκριμένα, κατά την αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα η συμπύκνωση μιας ενεργοποιημένης ακετυλομάδας (ακέτυλο-ACP) με μια ενεργοποιημένη μηλονυλομάδα (μηλονύλο-ACP) και σχηματίζεται μία ακετοακετυλική ομάδα. Η αντίδραση αυτή οδηγεί στην απελευθέρωση ενός μορίου διοξειδίου του άνθρακα. Στην συνέχεια, το ακετοακέτυλο-ACP ανάγεται από το NADPH (φωσφορικό νικοτινάμιδο αδένινο νουκλεοτίδιο). Ακολουθεί αφυδάτωση του προϊόντος β-υδρόξυθειολο εστέρας με αποτέλεσμα την δημιουργία διπλού δεσμού στο μόριο, ο οποίος ανάγεται περαιτέρω από το NADPH προς βουτυρύλο-ACP. Η βιοσύνθεση λιπιδίων απαιτεί λόγο ακέτυλο-CoA προς NADPH 1:2. Το NADPH που είναι απαραίτητο για την ολοκλήρωση των αναγωγικών διεργασιών παρέχεται, είτε από το μηλικό ένζυμο (ME) στον κύκλο αντιδράσεων πυροσταφυλικού/οξαλοξικού/μηλικής τρανσυδρογονάσης είτε μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών. Η συμπύκνωση δύο ενεργοποιημένων ακέτυλο-ACP προς μία ενεργοποιημένη βουτυρύλο-ACP με τέσσερα άτομα άνθρακα και η περαιτέρω συμπύκνωση της ενεργοποιημένης βουτυριλοομάδας με ένα ενεργοποιημένο μηλονύλο-ACP έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός μορίου με έξι άτομα άνθρακα. Κάθε επανάληψη της ίδιας διαδικασίας οδηγεί στην προσθήκη δύο ακόμα ατόμων άνθρακα στην αλυσίδα έως ότου σχηματιστεί το παλμιτικό οξύ (C16:0). Περαιτέρω επιμήκυνση της αλυσίδας επιτυγχάνεται με αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν, με την διαφορά ότι δότης των δύο ατόμων άνθρακα είναι το ακέτυλο-CoA και όχι το μηλονύλο-ACP (Ratledge, 2014).

Η εισαγωγή διπλών δεσμών στα λιπαρά οξέα πραγματοποιείται από υδρόφοβες και δεσμευμένες στην μεμβράνη πρωτεΐνες που ονομάζονται αποκορεσμάσες. Το υπόστρωμά τους αποτελείται είτε από ακύλο-CoA είτε από υπολείμματα ακυλίου συνδεδεμένα στην κεφαλή ενός φωσφολιπιδίου. Οι πιο συχνά εντοπιζόμενες αποκορεσμάσες στις ζύμες είναι οι Δ9 και Δ12. Η Δ9 καταλύει την εισαγωγή του πρώτου διπλού δεσμού σε ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ (C16:0 και C18:0) και είναι η μόνη αποκορεσμάση που δρα σε ένα κορεσμένο ακύλο-CoA παρά σε ένα φωσφολιπίδιο. Η αποκορεσμάση Δ12 καταλύει την εισαγωγή του δεύτερου διπλού δεσμού μεταξύ των ανθράκων 12 και 13 στο ελαϊκό οξύ (C18:1, n-9) για τον σχηματισμό λινελαϊκού οξέος (C18:2, n-6). Περαιτέρω, η αποκορεσμάση Δ15, εάν



υπάρχει, εισάγει τον τρίτο διπλό δεσμό στο λινελαϊκό οξύ και το μετατρέπει σε γ-λινολενικό οξύ (C18:3, n-3) (Beopoulos, 2011).

Τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται ως δομικά στοιχεία για διάφορα λιπίδια, συμπεριλαμβανομένων των τριακυλογλυκερολών (TAGs), μέσω της οδού Kennedy (Davies & Holdsworth, 1992; Müllner & Daum, 2004). Μετά τη βιοσύνθεση των λιπαρών CoA εστέρων λαμβάνει χώρα η εστεροποίησή τους με μόρια γλυκερόλης με σκοπό την αποθήκευσή τους ως TAGs. Η σύνθεση αυτή διεξάγεται μέσω του μεταβολικού μονοπατιού ακυλίωσης α-φωσφορικής γλυκερόλης (Εικόνα 7). Στο πρώτο βήμα της σύνθεσης, η 3-φωσφορική γλυκερόλη (G-3-P) ακυλιώνεται από το ένζυμο G-3-P ακυλτρανφεράση (GAT) στη θέση sn-1 προς τον σχηματισμό 1-ακυλο-3-φωσφορικής γλυκερόλης (λυσοφωσφατιδικό οξύ, LPA). Στη συνέχεια, το λυσοφωσφατιδικό οξύ ακυλιώνεται περαιτέρω από το ένζυμο ακυλτρανφεράση του λυσοφωσφατιδικού οξέος στη θέση sn-2 και σχηματίζεται φωσφατιδικό οξύ (PA). Ακολουθείται αποφωσφορυλίωση του φωσφατιδικού οξέος από το ένζυμο φωσφοϋδρολάση του φωσφατιδικού οξέος (PAP) για την απελευθέρωση διακυλογλυκερόλης (DAG). Τελικώς, η διακυλογλυκερόλη ακυλιώνεται είτε μέσω του ενζύμου ακυλτρανφεράση της διακυλογλυκερόλης ή μέσω του ενζύμου ακυλτρανφεράση της φωσφολιπιδιακής διακυλογλυκερόλης για τον σχηματισμό TAG (Papanikolaou & Aggelis, 2011; Davies & Holdsworth, 1992; Müllner & Daum, 2004).



**Εικόνα 7. Σχηματισμός ενδοκυτταρικών τριακυλογλυκερολών μέσω της οδού α-φωσφορικής γλυκερόλης (Ratledge, 1988).**

### 1.2.3 Εφαρμογές μικροβιακών λιπιδίων

Οι ελαιογόνες ζύμες αποτελούν κατάλληλους μικροοργανισμούς παραγωγής λιπιδίων και κατ' επέκταση προϊόντων με ισοδύναμες ή βελτιωμένες ιδιότητες σε σύγκριση με εκείνα που προέρχονται από τους ορυκτούς πόρους. Παράλληλα, σε σχέση με τα έλαια φυτικής προέλευσης, οι ζύμες έχουν μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης και δεν επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την εποχιακή παραγωγή ή τη γεωγραφική θέση. Δεν υπάρχει ανταγωνισμός με την παραγωγή τροφίμων ή ζωοτροφών, καθώς αναπτύσσονται σε ακατέργαστες ανανεώσιμες πηγές άνθρακα, συμπεριλαμβανομένων των γεωργικών υπολειμμάτων, των βιομηχανικών αποβλήτων και των μη εδωδιμων καλλιεργειών. Επιπλέον, η ευκολία καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα, ο αυξανόμενος αριθμός γενετικών εργαλείων και η εμφάνιση νέων τεχνικών επεξεργασίας, είναι κάποια από τα πλεονεκτήματα που έχουν ενισχύσει τη χρήση τους για την ανάπτυξη τέτοιου είδους διεργασιών (Koutinas et al., 2014).

Καθώς τα ζητήματα για την προστασία του περιβάλλοντος και η εξάντληση των αποθεμάτων αργού πετρελαίου γίνονται οι πρωταρχικές προκλήσεις που απαιτείται να αντιμετωπίσουν οι βιομηχανίες, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι οι βιοτεχνολογικές εταιρείες επενδύουν όλο και περισσότερο στην ανάπτυξη βιοκαυσίμων πρώτης και δεύτερης γενιάς από φυτά και υπολείμματα καλλιεργειών (Mahmood et al., 2019; Saha et al., 2020). Μία τέτοια περίπτωση αποτελεί το βιοντίζελ, ένα ανανεώσιμο, ασφαλές και μη τοξικό βιοκαύσιμο το οποίο μπορεί να παραχθεί από μια μεγάλη ποικιλία εδώδιμων και μη εδώδιμων πρώτων υλών. Συγκεκριμένα, οι λιπαρές πρώτες ύλες μετατρέπονται σε βιοντίζελ μέσω ομοιογενώς ή ετερογενώς καταλυόμενης μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων με μεγάλη αλυσίδα σε μικρότερους εστέρες με ευθείες αλυσίδες (Gui et al., 2008). Αυξημένο ενδιαφέρον υπάρχει επίσης στην παραγωγή των μικροβιακών λιπιδίων για φαρμακευτικές και διαιτητικές χρήσεις όταν αυτά είναι πλούσια σε σπάνια πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το αραχιδονικό και το γ-λινολενικό, αλλά και στη μετατροπή τους σε ελαιοχημικά όπως επιφανειοδραστικές ουσίες, διαλύτες, χρώματα, κεριά, πλαστικά και λιπαντικά (Markande et al., 2021; Oklu et al., 2019; Mirpoor et al., 2021; Patel et al., 2006; Koutinas et al., 2014; Ratledge & Wynn, 2002). Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μόνο τα υψηλής αξίας λίπη έχουν πιθανότητες να παραχθούν με βιοτεχνολογικά μέσα, καθώς επί του παρόντος οι μικροοργανισμοί δεν δύναται να παράγουν τα κοινά έλαια και λίπη τόσο οικονομικά όσο οι φυτικές και ζωικές πηγές (Beopoulos et al., 2011).

### 1.3 Εκχύλιση λιπιδίων

Κατά τις διεργασίες των μικροβιακών ζυμώσεων έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές για την αύξηση των συσσωρευμένων λιπιδίων εντός των μικροβιακών κυττάρων. Ωστόσο, ο αποτελεσματικός διαχωρισμός των ενδοκυτταρικών λιπιδίων είναι ένα από τα σημεία που απαιτούνται ώστε η χρήση μικροβιακών ελαίων να καθίσταται οικονομικά βιώσιμη (Dong et al., 2016). Τα κύτταρα των ζυμών συντίθενται από παχιά και άκαμπτα κυτταρικά τοιχώματα που κάνουν την εκχύλιση των λιπιδίων ιδιαίτερα δύσκολη. Το γεγονός ότι κάθε είδος ζύμης είναι πιθανό να παρουσιάζει διαφορετικές φυσικές ιδιότητες και κυτταρική δομή καθώς και διαφορετική συγκέντρωση λιπιδίων απαιτεί διαφορετική μέθοδο και βελτιστοποίηση για κάθε είδος. Για τον λόγο αυτό, σε πολλές περιπτώσεις, εφαρμόζονται μέθοδοι

προεπεξεργασίας που περιλαμβάνουν την διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος μετά την διεργασία της ζύμωσης (Zainuddin et al., 2021).

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν την εκχύλιση των λιπιδίων από ελαιογόνες ζύμες κάνουν αναφορά στην εκχύλισή τους από ξηρή βιομάζα καθώς έτσι επιτυγχάνεται μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης σε σχέση με την υγρή βιομάζα. Όμως, παρά την υψηλή ανάκτηση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων, ένα από τα κύρια εμπόδια είναι το υψηλό κόστος που προκύπτει από τις ενεργειακές δαπάνες κατά τη διαδικασία της ξήρανσης (Xu et al., 2011b). Επιπλέον, η επεξεργασία της ξήρανσης μπορεί να προκαλέσει αποδόμηση και οξείδωση των λιπιδίων λόγω εφαρμογής υψηλών θερμοκρασιών. Η παρουσία νερού στη βιομάζα εμποδίζει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εκχύλισης εξαιτίας της περιορισμένης προσβασιμότητας του διαλύτη στα λιπίδια, στη μείωση του ρυθμού μεταφοράς μάζας και στο σχηματισμό γαλακτωμάτων (Balasubramanian et al., 2013; Halim et al., 2012). Ως εκ τούτου, η εντατική έρευνα είναι απαραίτητη για την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην εκχύλιση λιπιδίων από υγρή βιομάζα, ώστε να επιτραπεί η εφαρμογή της μεθόδου σε βιομηχανική κλίμακα.

### **1.3.1 Δομή κυτταρικών τοιχωμάτων**

Τα περισσότερα από τα λιπίδια στις ελαιογόνες ζύμες είναι ενδοκυτταρικά και αποθηκεύονται στα λιποσωμάτια, όπως περιγράφηκε στο εδάφιο 1.2.2. Εκτός από τα λιποσωμάτια, τα λιπίδια περιλαμβάνουν επίσης λιπόφιλες αρωματικές ενώσεις που είναι δύσκολο να αφαιρεθούν κατά τον διαχωρισμό. Η αξιολόγηση της ποσότητας των εκχυλισμένων λιπιδίων μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας μεθόδους με βάση τη χρήση οργανικών διαλυτών όπως εξάνιο, μεθανόλη ή χλωροφόρμιο. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες συμπεραίνουν ότι δεν υπάρχει αποτελεσματική μέθοδος εκχύλισης που να μπορεί να αποδώσει το σύνολο των λιπιδίων από τη βιομάζα (Ageitos et al., 2011). Επιπλέον, οι μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι διαφορετικές μεταξύ των ελαιογόνων ειδών λόγω διαφορετικών φυσικών ή βιολογικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένων των διαφορών στο κυτταρικό τοίχωμα και της σύνθεσης των λιπιδίων (Yu et al., 2015).

Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος των ζυμών είναι παχύτερη από ότι στα θετικά κατά Gram βακτήρια και περίπου το ένα τέταρτο του ξηρού τους βάρους αποδίδεται σε αυτό. Το πάχος τους κυμαίνεται από 100 έως 200 nm (Liu et al., 2016)

και αποτελείται κυρίως από γλυκάνη, έναν πολυσακχαρίτη που περιέχει  $\beta$ -(1,3) και  $\beta$ -(1,6) δεσμούς γλυκόζης. Αυτοί οι δεσμοί παρέχουν στα κύτταρα σταθερή δομή, σχήμα και ελαστικότητα (Bzducha-Wróbel et al., 2014). Εκτός από τις γλυκάνες, στα τοιχώματα απαντάται μια κατηγορία πολυσακχαριτών που ονομάζονται μαννάνες, αποτελούμενες από μονομερή μαννόζης που συνδέονται με  $\alpha$ -(1,6) δεσμούς και με μια μικρή πλευρική αλυσίδα ολιγοσακχαρίτη. Επιπλέον συστατικά υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες, όπως χιτίνη, πρωτεΐνες, λιπίδια και ανόργανα φωσφορικά άλατα (Geciova et al., 2002). Το σύμπλεγμα  $\beta$ -(1,3)-D-γλυκάνης-χιτίνης είναι σημαντικό μέρος του εσωτερικού του κυτταρικού τοιχώματος και αποτελεί το ινώδες του. Στο εξωτερικό του περιέχονται μαννοπρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη διαπερατότητα των κυττάρων. Το εξωτερικό και το εσωτερικό κυτταρικό τοίχωμα συνδέονται με  $\beta$ -(1,6)-D-γλυκάνη. Ενώ η περιεκτικότητα σε χιτίνη συμβάλλει στην αντοχή του τοιχώματος, η  $\beta$ -(1,6)-D-γλυκάνη συνδέεται με ομοιοπολικούς δεσμούς με τη  $\beta$ -(1,3)-D-γλυκάνη, τις μαννοπρωτεΐνες και τη χιτίνη, με τους δεσμούς αυτούς να συμβάλουν στη σπονδυλωτή δομή του κυτταρικού τοιχώματος (Kollar, 1997).

### **1.3.2 Προεπεξεργασία και διάτρηση κυττάρων**

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί με στόχο να διαταράσσουν τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών. Με την παρουσία διαλυτών, τα μικροβιακά κύτταρα συνήθως ομογενοποιούνται, αλλά απαιτείται η παροχή μηχανικής ενέργειας για την ρήξη τους και την επίτευξη υψηλότερης ποσότητας εκχυλισμένων λιπιδίων μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Γενικά, η διάτρηση των κυττάρων της βιομάζας για την ανάκτηση των λιπιδίων πραγματοποιείται κυρίως με τρεις διαφορετικούς τρόπους, ανάλογα με την περιεκτικότητα σε υγρασία και την ευκολία της διεργασίας. Κατά την πρώτη προσέγγιση, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση, πλένονται με νερό για να απομακρυνθούν τα ξένα υλικά και υποβάλλονται σε εκχύλιση με διαλύτη. Αυτή η μέθοδος μπορεί να ανακτήσει μόνο τα ευκόλως διαλυτά λιπίδια. Εναλλακτικά, κατά τη δεύτερη προσέγγιση, η συλλεγόμενη βιομάζα μετά από πλύσεις με νερό ξηραίνεται είτε με λυοφιλίωση είτε με θερμική ξήρανση και αργότερα υποβάλλεται σε φυσική, χημική ή ενζυμική επεξεργασία, ακολουθούμενη από έκπλυση στην περίπτωση που υποβληθεί σε χημική ή βιοχημική επεξεργασία. Κατά την τρίτη προσέγγιση, το μέσο της ζύμωσης που περιέχει τα κύτταρα υποβάλλεται σε απευθείας επεξεργασία με οποιοδήποτε από τα παραπάνω μέσα, ακολουθούμενη από πλύση, ξήρανση, ανάμειξη με διαλύτη και εκχύλιση (Khot et al., 2020).

Συνήθως εφαρμόζονται μηχανικές μέθοδοι για την διάτρηση των κυττάρων, όπως εφαρμογή μηχανικών δυνάμεων ή μεταφορά ενέργειας με κύματα, θερμότητα ή ηλεκτρικό ρεύμα (Patel et al., 2018). Αυτές οι μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την αποτελεσματική ανάκτηση ενδοκυτταρικών λιπιδίων από διάφορες ελαιογόνες ζύμες με τον πιο σημαντικό παράγοντα να αποτελεί η κατανάλωση ενέργειας (Koubaa et al., 2020). Μηχανικές μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι η άλεση με σφαιρίδια, η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους, η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης και υψηλής ταχύτητας και η εκχύλιση υπό την επίδραση μικροκυμάτων (Zainuddin et al., 2021). Παρόλα αυτά, η μεγάλη διάρκεια διεργασίας και η υψηλή ενεργειακή κατανάλωση καθιστούν τις συμβατικές μηχανικές μεθόδους οικονομικά μη βιώσιμες αντιπροσωπεύοντας το 70% του συνολικού κόστους παραγωγής (Yenkie et al., 2017).

Ως εναλλακτικές των παραπάνω μεθόδων έχουν πραγματοποιηθεί μη μηχανικές τεχνικές όπως η εκχύλιση με τη χρήση ενζύμων, όξινη ή αλκαλική υδρόλυση και εφαρμογή οσμωτικού σοκ. Η χρήση βιολογικών μεθόδων όπως η ενζυμική επεξεργασία για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση λόγω της πρόληψης της θερμικής αποικοδόμησης των λιπιδίων και έχει εφαρμοστεί ευρέως για την εκχύλιση λιπιδίων από ελαιογόνα φυτά. Αποτελεί μια απλή και εύκολη διεργασία με χαμηλή κατανάλωση ενέργειας. Επιπλέον, η διαδικασία είναι απαλλαγμένη από τη χρήση επιβλαβών διαλυτών και ακραίων φυσικών συνθηκών, όπως στην περίπτωση των μηχανικών μεθόδων (Latif & Anwar, 2011). Ο μηχανισμός της διάσπασης των κυττάρων από την όξινη υδρόλυση στοχεύει κυρίως την απελευθέρωση δεσμευμένων λιπιδίων με διάσπαση των διαμοριακών δυνάμεων λιπιδίου-αμύλου και λιπιδίου-πρωτεΐνης. Η χρήση υδροχλωρικού οξέος έχει χρησιμοποιηθεί για τυπική εκχύλιση σε αρκετές ελαιογόνες ζύμες (Yu et al., 2015; Soccol et al., 2017). Ομοίως, η αλκαλική διεργασία συχνά επιλέγεται για να καταλύσει την υδρόλυση πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών. Ωστόσο, σε σύγκριση με την όξινη, η συγκεκριμένη επεξεργασία είναι λιγότερο αποτελεσματική και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται σπάνια για την ανάκτηση μικροβιακών λιπιδίων (Zainuddin et al., 2021). Τέλος, κατά τη διαδικασία του οσμωτικού σοκ εφαρμόζεται υψηλή οσμωτική πίεση στο κύτταρο όταν αυτό εμπεριέχεται σε μέσο με υψηλή συγκέντρωση διαλυμένης ουσίας. Στη συνέχεια ακολουθείται αραίωση του μέσου, σχηματίζοντας ένα περιβάλλον πλούσιο σε νερό.

Λόγω της διαφοράς στην οσμωτική πίεση, παρατηρείται κίνηση των μορίων του νερού εντός του κυττάρου με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυτταρικής πίεσης και τη μείωση της αντοχής του κυτταρικού τοιχώματος (Ochsenreither et al., 2016).

### 1.3.3 Μέθοδοι εκχύλισης λιπιδίων

Οι περισσότερες μέθοδοι εκχύλισης μικροβιακών λιπιδίων περιλαμβάνουν μια μέθοδο κυτταρικής ρήξης ακολουθούμενη από εκχύλιση με οργανικό διαλύτη. Διάφοροι οργανικοί διαλύτες έχουν προταθεί για την εκχύλιση των λιπιδίων από ελαιογόνες ζύμες, με τις μεθόδους Soxhlet, Bligh & Dyer και Folch να είναι οι τρεις κλασικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται εκτενώς. Η ταχύτητα και η ευκολία των διεργασιών αυτών είναι τα κύρια πλεονεκτήματα. Ωστόσο, είναι λιγότερο ευαίσθητες σε σύγκριση με άλλες αναδυόμενες μεθόδους (Zainuddin et al., 2021).

Η μέθοδος Soxhlet είναι μια τυπική μέθοδος εργαστηριακής κλίμακας για την εκχύλιση λιπιδίων. Κατά τη διαδικασία αυτή ένας οργανικός διαλύτης, συνήθως εξάνιο, χρησιμοποιείται για την διάρρηξη της βιομάζας. Ο διαλύτης εξατμίζεται σε φιάλη με στρογγυλό πυθμένα και το συμπύκνωμα διηθείται εντός της κονιορτοποιημένης βιομάζας πριν την αναρροή του στη φιάλη. Μετά από αρκετούς κύκλους εξάτμισης, συμπύκνωσης και διήθησης του διαλύτη μέσω του δείγματος, η φιάλη που περιέχει ένα μείγμα διαλύτη και εκχυλισμένων λιπιδίων αφαιρείται για να ανακτηθούν τα ακατέργαστα λιπίδια μετά την εξάτμιση του διαλύτη χρησιμοποιώντας περιστροφικό εξατμιστήρα (Ranjan et al., 2010). Οι Dalmas Neto et al. (2019) αξιολόγησαν την απόδοση τριών διαφορετικών διαλυτών με τη συγκεκριμένη μέθοδο για την εκχύλιση λιπιδίων από στέλεχος της ζύμης *R. toruloides*. Οι ποσότητες των λιπιδίων που εκχυλίστηκαν ήταν 46,1%, 44,7% και 43,2% για εξάνιο, χλωροφόρμιο/μεθανόλη και χλωροφόρμιο αντίστοιχα. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα των πολικών διαλυτών όπως η αιθανόλη βρέθηκε να είναι υψηλότερη από αυτή που παρατηρήθηκε για μη πολικούς διαλύτες, όπως το εξάνιο, για την εκχύλιση πολικών λιπιδίων (Li et al, 2014). Σε σύγκριση με την μέθοδο Bligh & Dyer χρησιμοποιώντας μεθανόλη/χλωροφόρμιο (2:1 v/v), η εκχύλιση Soxhlet χρησιμοποιώντας το ίδιο μείγμα διαλυτών με συχνότητα 5 κύκλων ανά ώρα βρέθηκε να είναι λιγότερο αποτελεσματική στην εκχύλιση λιπιδίων από το *R. glutanis*, με 98% και 50% απόδοση εκχύλισης αντίστοιχα (Cescut et al., 2011) Τέλος, το μειονέκτημα

του μεγάλου χρόνου λειτουργίας της συμβατικής εκχύλισης Soxhlet (συνήθως 8 ώρες) μπορεί να ξεπεραστεί συνδυάζοντας την μέθοδο αυτή με θέρμανση σε μικροκύματα, με τον χρόνο λειτουργίας να μειώνεται σε λιγότερο από 1 ώρα (Virost et al., 2007).

Η μέθοδος Bligh & Dyer (1959) είναι επίσης μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος και χρησιμοποιεί τον συνδυασμό διαφορετικών διαλυτών που αποτελούνται από χλωροφόρμιο/μεθανόλη/νερό (1:2:0,25, v/v/v). Το μονοφασικό τριμερές σύστημα μετατρέπεται σε κατάσταση δύο φάσεων με αραίωση με επιπλέον χλωροφόρμιο και νερό. Αυτός ο συνδυασμός διαλυτών και νερού σε αυτή την αναλογία σχηματίζει τις δύο φάσεις, με την κατώτερη φάση (χλωροφόρμιο) να περιέχει όλα τα εκχυλισμένα λιπίδια. Η μέθοδος Folch είναι σχεδόν πανομοιότυπη με τη μέθοδο Bligh & Dyer, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται διαφορετική αναλογία διαλυτών, όπως χλωροφόρμιο:μεθανόλη (2:1 v/v). Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει πλύση του εκχυλίσματος με την προσθήκη ορισμένης ποσότητας διαλύματος άλατος. Το μείγμα οδηγείται σε διαχωρισμό δύο φάσεων, με την κατώτερη φάση να αποτελείται από το χλωροφόρμιο και τα ουδέτερα λιπίδια και την ανώτερη φάση από τα πολικά συστατικά (Folch et al., 1957).

#### **1.3.4 Χρήση πράσινων διαλυτών**

Οι παραγόμενοι από πετρέλαιο διαλύτες είναι αυτοί που κυρίως χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση λιπιδίων από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Το εξάνιο και το διάλυμα Folch χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς έχουν εξαιρετική ικανότητα ανάκτησης των λιπιδίων και χαμηλό σημείο εξάτμισης (<69°C). Παρόλα αυτά, χαρακτηρίζονται ως τοξικά για την ανθρώπινη υγεία και επιβλαβή για το περιβάλλον (Kumar et al., 2017a). Για τον λόγο αυτό, κρίνεται αναγκαία η αναζήτηση “πράσινων” διαλυτών ως αντικαταστάτες των συμβατικών χωρίς να διακυβεύεται η απόδοση ανάκτησης των μικροβιακών λιπιδίων.

Οι πράσινοι διαλύτες είναι μια κατηγορία διαλυτών που στοχεύουν κυρίως στην ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκύπτουν από τη χρήση των διαλυτών ορυκτής προέλευσης (Capello et al., 2007). Για να θεωρηθεί ένας διαλύτης πράσινος, θα πρέπει να πληροί τις περισσότερες από τις 12 θεμελιώδεις αρχές της πράσινης χημείας. Αυτές οι αρχές συνοψίζουν την ορθή και μεθοδολογική



χρήση των χημικών ουσιών, με προτίμηση στη χρήση ανανεώσιμων ή αβλαβών πρώτων υλών που δεν παραμένουν στο περιβάλλον (Anastas & Kirchhoff, 2002).

Σε αναζήτηση κατάλληλων εναλλακτικών διαλυτών, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η εκχύλιση λιπιδίων μπορεί να γίνει με διαλύτες βιολογικής προέλευσης που είναι αποτελεσματικοί, φιλικό προς το περιβάλλον και οικονομικά αποδοτικοί. Τα τερπένια εξάγονται από είδη εσπεριδοειδών και διαθέτουν εξαιρετικές χημικές και τεχνικές ιδιότητες για την εκχύλιση λίπους. Αρκετά τερπένια όπως το *d*-λεμονένιο, το *p*-κυμένιο και το κόμμι τερεβινθίνης προέρχονται από φλούδες εσπεριδοειδών, πεύκων και ελαίων από φύλλα διάφορων φυτών αντίστοιχα. Από αυτές τις χημικές ενώσεις, το *d*-λεμονένιο έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση λιπιδίων σε άλγη *Chlorella vulgaris* με την ποιότητα και την απόδοση που ελήφθησαν να είναι παρόμοια σε σύγκριση με το εξάνιο (Tanzi et al., 2012). Επιπλέον, δεν ικανοποιεί μόνο τις ιδιότητες διαλυτότητας αλλά θεωρείται και ως εναλλακτικός διαλύτης λόγω του χαμηλού κόστους και των ιδιοτήτων απολίπανσης (Toplisek & Gustafson, 1995; Chemat et al., 2012).

Εκτός από τα τερπένια, ένας άλλος τύπος πράσινων διαλυτών προέρχεται από γεωργικές ή βιολογικές πρώτες ύλες. Η χρήση αυτών των διαλυτών ως αντικαταστάτες των συμβατικών όχι μόνο παρέχει περιβαλλοντικά οφέλη αλλά επίσης αποφεύγει την δαπανηρή οδό παραγωγής με βάση το πετρέλαιο. Πρόσφατα, οι διαλύτες βιολογικής προέλευσης που διατίθενται στο εμπόριο περιλαμβάνουν τους οξικό και γαλακτικό αιθυλεστέρα και μεθυλεστέρες που παράγονται από ανανεώσιμες πηγές όπως το καλαμπόκι, τα εσπεριδοειδή και τη σόγια. Το χαμηλότερο ιξώδες τους, τους καθιστά εύκολους στον χειρισμό σε εφαρμογές εκχύλισης με διαλύτες, χωρίς εξάτμιση. Τα πλεονεκτήματά τους, δηλαδή η χαμηλή τοξικότητα, η βιοαποικοδομησιμότητα και η ανανεώσιμη φύση τους, τους καθιστούν ως ιδανικούς διαλύτες για την εκχύλιση λιπιδίων. Τελικώς, οι διαλύτες αυτοί θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τους συμβατικούς και άλλους πράσινους διαλύτες σε διαφορετικές βιομηχανικές διεργασίες εκχύλισης. Ωστόσο, το κύριο μέλημα για τους διαλύτες βιολογικής προέλευσης παραμένει η συνεπής παροχή των πρώτων υλών από τις οποίες προέρχονται. Επιπλέον, η απόδοση των διαλυτών σε μεγάλη κλίμακα και οι θερμοδυναμικές μελέτες των διεργασιών εκχύλισης πρέπει να εξεταστούν περαιτέρω (Kumar et al., 2017b).

## 2. Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η βιοτεχνολογική αξιοποίηση οξικού οξέος και υδρολυμάτων βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών από ελαιογόνες ζύμες για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και η μελέτη της ανάκτησής τους με τη χρήση πράσινων οργανικών διαλυτών.

Αρχικά, εξετάστηκαν τρεις διαφορετικοί ελαιογόνοι μικροοργανισμοί (*C. curvatus* ATCC 20509, *L. starkeyi* DSM 70296 και *R. toruloides* NRRL Y-27012) ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται και να συσσωρεύουν μικροβιακό λίπος. Κατά την πειραματική διαδικασία, έλαβαν χώρα ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις οργανικών οξέων ως μοναδική πηγή άνθρακα στο θρεπτικό τους μέσο, με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης του υποστρώματος και της κατανάλωσής του. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες με προσθήκη υδρολυμάτων βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για την παραγωγή και συσσώρευση λίπους. Ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 μελετήθηκε περαιτέρω σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα.

Κατά την μελέτη της εκχύλισης των μικροβιακών λιπιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες οξικός αιθυλεστέρας, 1,3-διοξολάνη και *d*-λεμονένιο για την αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών. Πραγματοποιήθηκαν διεργασίες ανάκτησης με διαφορετικούς χρόνους ανάδευσης, διαφορετικές θερμοκρασίες και με τη χρήση υπερήχων για την διάτρηση των κυττάρων. Τέλος, αναλύθηκε το προφίλ των λιπαρών υλών για τον προσδιορισμό της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1 Μικροοργανισμοί

Κατά την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν οι μικροοργανισμοί *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 (American Type Culture Collection-ATCC, Manassas, Virginia, U.S.A.), *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Germany) και *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 (ARS Culture Collection-NRRL, Peoria, Illinois, U.S.A.).

#### 3.2 Παρασκευή προκαλλιέργειας

Η παρασκευή και η ανάπτυξη των προκαλλιιεργειών πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες 250 mL (Erlenmeyer baffled flasks) με ενεργό όγκο 50 mL. Το θρεπτικό μέσο περιείχε 10 g/L γλυκόζη, 10 g/L εκχύλισμα ζύμης και 10 g/L πεπτόνη. Όλα τα υλικά και τα θρεπτικά μέσα αποστειρώθηκαν στους 121°C για 20 min σε αυτόκαυστο (Systec, VX-150), με την γλυκόζη να αποστειρώνεται ξεχωριστά. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με εμπλουτισμό κυττάρων από φιαλίδια (cryovials) ή από στερεή καλλιέργεια σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Laminar) υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι εμβολιασμένες κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης (Shaker, New Brunswick Sc, USA) υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ( $30\pm 1^\circ\text{C}$ ) και ανάδευσης ( $200\pm 5$  rpm) για περίπου 24 ώρες. Στη συνέχεια και υπό ασηπτικές συνθήκες, κατάλληλη ποσότητα εμβολίου (10%, v/v) προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης τόσο στις ασυνεχείς όσο και στις ημισυνεχείς καλλιέργειες.

Η ανανέωση των μικροοργανισμών και η ανάπτυξή τους σε στερεές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε γυάλινους σωλήνες (slants) και σε τρυβλία Petri. Το θρεπτικό μέσο περιείχε 10 g/L γλυκόζη, 10 g/L εκχύλισμα ζύμης, 10 g/L πεπτόνη και 20 g/L άγαρ. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν στους 30°C για 24 ώρες. Μετά την επώαση, τα ανεπτυγμένα στελέχη ζύμης συντηρήθηκαν στους 4°C μέχρι περαιτέρω χρήσης. Επιλεγμένες αποικίες από κάθε τρυβλίο ή σωλήνα μεταφέρθηκαν με μικροβιολογικό κρίκο σε υγρό θρεπτικό μέσο. Οι μικροοργανισμοί φυλάσσονταν σε φιαλίδια (cryovials) σε διάλυμα γλυκερόλης 50% (v/v) υπό συνθήκες κατάψυξης ( $-80^\circ\text{C}$ ).

### 3.3 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων σε ασυνεχείς ζυμώσεις

Οι τρεις μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν για την παραγωγή μικροβιακού λίπους εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να καταναλώνουν οργανικά οξέα, ορισμένα από τα οποία αποτελούν μονομερή βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες 500 mL (Erlenmeyer baffled flasks) (Εικόνα 8) με ενεργό όγκο 100 mL και αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις από εμπορικά οξέα (5, 10, 20 g/L) ως πηγή άνθρακα. Χρησιμοποιήθηκαν οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ και κροτονικό οξύ με σκοπό να εξεταστεί η επίδρασή τους στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών και στη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους.



**Εικόνα 8. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες 500 mL (Erlenmeyer baffled flasks)**

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε υπόστρωμα με βάση υδρολύματα βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και αναλογίες για την αξιολόγηση των μικροοργανισμών να αναπτύσσονται και να παράγουν μικροβιακό λίπος. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν υδρόλυματα PLA και PHB ως

πηγή άνθρακα με διαφορετικές κατά περίπτωση συγκεντρώσεις. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης 1 g/L και βακτηριακή πεπτόνη 2 g/L. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων του οποίου η συγκέντρωση παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Το σύνολο των ζυμώσεων έλαβε χώρα σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Τα θρεπτικά συστατικά αποστειρώθηκαν στους 121°C για 20 min και όλες οι επεμβάσεις έλαβαν χώρα υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 30±1°C και ανάδευση 200±5 rpm. Το pH ρυθμίστηκε στο 6 με προσθήκη 5M NaOH κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων και ο όγκος του εμβολίου ήταν σε κάθε περίπτωση 10% (v/v).

**Πίνακας 1. Μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων θρεπτικού μέσου**

| Σύσταση μίγματος αλάτων και ιχνοστοιχείων   |       |
|---|-------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)       | 7     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)      | 2,5   |
| FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O (g/L) | 0,15  |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (g/L) | 1,5   |
| MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O (g/L)  | 0,06  |
| ZnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O (g/L)  | 0,02  |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (g/L) | 0,015 |

### 3.3.1 Υδροθερμική επεξεργασία βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών

Για την υδρόλυση των πολυμερών πραγματοποιήθηκε υδροθερμική επεξεργασία. Πιο συγκεκριμένα, για την παραλαβή των μονομερών του PLA, κατάλληλη ποσότητα συγκέντρωσης 100 g/L στερεού PLA υπέστη επεξεργασία στους 140°C για 4 ώρες, με το υδρόλυμα που προέκυψε να περιέχει γαλακτικό οξύ σε συγκέντρωση 124 g/L. Αντίστοιχα, διενεργήθηκε υδρόλυση κατάλληλης ποσότητας στερεού PHB συγκέντρωσης 40 g/L με προσθήκη 0,6% NaOH 10M στους 80°C για 30 ώρες, με 35 g/L τελική συγκέντρωση μονομερών και αναλογία αυτών σε 3-υδρόξυ-βουτυρικό (3HB) και κροτονικό οξύ 2:1. Για τη χρήση των υδρολυμάτων ως μέσο ζύμωσης πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 9.000 rpm για 10 min στους

4°C και έπειτα φιλτράρισμα σε αντλία κενού με φίλτρο 0,2 μm για την απομάκρυνση των μη διαλυτών στερεών από το διάλυμα.

### **3.4 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα**

Από τα αποτελέσματα των ασυνεχών ζυμώσεων σε κωνικές φιάλες, επιλέχθηκε ο πιο αποδοτικός μικροοργανισμός ως προς την ικανότητα συσσώρευσης μικροβιακών λιπιδίων. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 1 L (Eppendorf, BioFlo 120) (Εικόνα 9) με ενεργό όγκο 0,7 L. Ως αρχική πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά οξικό οξύ και υδρόλυμα PLA με αρχική συγκέντρωση 20 g/L. Χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης συγκέντρωσης 6 g/L ως πηγή αζώτου και μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων με σύσταση όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Καθ' όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων υπήρχαν σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (30°C) και το pH ήταν ρυθμισμένο στο 6 με αυτόματη προσθήκη NaOH 10M και HCl 5M. Ο ρυθμός ανάδευσης στον βιοαντιδραστήρα ρυθμίστηκε έτσι ώστε να διατηρηθεί το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου (DO) στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα πάνω από το 20% με σταθερό αερισμό στα 1 vvm. Όταν η συγκέντρωση των πηγών άνθρακα στο υγρό της ζύμωσης ήταν περίπου 5 g/L πραγματοποιήθηκε έναρξη συνεχούς τροφοδοσίας (feeding) πυκνού διαλύματος (συγκέντρωσης 300 g/L) με αντλία και με κατάλληλη παροχή έτσι ώστε η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα να παραμείνει σταθερή.



**Εικόνα 9. Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα Eppendorf, BioFlo 120 1 L**

### **3.5 Εκχύλιση μικροβιακών λιπιδίων με χρήση πράσινων διαλυτών**

#### **3.5.1 Ημι-συνεχής ζύμωση για την παραγωγή μικροβιακής βιομάζας**

Για την παραγωγή επαρκούς ποσότητας βιομάζας για την μελέτη της εκχύλισης των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 6,7 L (Bioengineering, RALF Advanced) (Εικόνα 10) και ενεργό όγκο 3 L με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509. Στην περίπτωση αυτή ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη με αρχική συγκέντρωση 70 g/L. Οι συνθήκες της καλλιέργειας που έλαβαν χώρα ήταν ίδιες με αυτές που αναφέρθηκαν στο εδάφιο 3.4. Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο μέσο της ζύμωσης ήταν περίπου 10 g/L πραγματοποιήθηκε προσθήκη πυκνού διαλύματος γλυκόζης (900 g/L).



**Εικόνα 10. Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα Bioengineering, RALF Advanced 6.7 L**

### **3.5.2 Ανάκτηση κυτταρικής βιομάζας**

Μετά τον τερματισμό της ημι-συνεχούς καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα ακολουθεί η διαδικασία ανάκτησης των μικροβιακών κυττάρων. Αρχικά, πραγματοποιείται μεταφορά του υγρού της ζύμωσης σε δοχείο ζέσεως ακολουθούμενη από θέρμανση στους 80°C με σκοπό την θανάτωση των κυττάρων και την απενεργοποίηση των ενζύμων. Στη συνέχεια, το υγρό φυγοκεντρείται (Sorvall Lynx 6000 Centrifuge) με ταχύτητα 9.000 rpm για 15 min σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται, η βιομάζα ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και μεταφέρεται σε κατάλληλα δοχεία του λυοφιλιωτή (freeze dryer) για απομάκρυνση της περιεχόμενης υγρασίας. Με το τέλος της ξήρανσης, η βιομάζα κονιορτοποιείται (Εικόνα 11) και αποθηκεύεται σε κατάψυξη (-18°C) μέχρι περαιτέρω ανάλυσης.

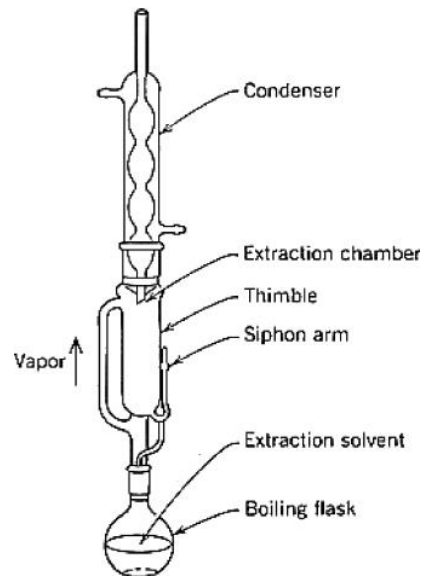




**Εικόνα 11. Κονιορτοποιημένη ξηρή βιομάζα της ζύμης *C. curvatus* ATCC 20509**

### **3.5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πλήρους εκχύλισης μικροβιακών λιπιδίων**

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας λίπους των κυττάρων, είναι απαραίτητη η πλήρης ανάκτησή του. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω εκχύλισης Soxhlet με την χρήση διαλύματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (2:1) (folch) ως διαλύτη εκχύλισης. Κατά την υλοποίηση της εκχύλισης, το δείγμα τοποθετείται σε μία ειδική πορώδη θήκη (thimble), η οποία μεταφέρεται σε ειδική υποδοχή της συσκευής Soxhlet, τον θάλαμο εκχύλισης. Στο κάτω μέρος της συσκευής τοποθετείται μία σφαιρική φιάλη, η οποία περιέχει τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Ο διαλύτης θερμαίνεται από θερμαντικό μανδύα και οι ατμοί φθάνουν μέσω ενός πλάγιου σωλήνα στον θάλαμο εκχύλισης, όπου συμπυκνώνονται και διαβρέχουν το δείγμα. Όταν ο διαλύτης φθάσει σε ένα συγκεκριμένο ύψος στην θάλαμο εκχύλισης, διενεργείται σιφωνισμός και μαζί με την ουσία που εκχύλισε, επιστρέφει στην σφαιρική φιάλη (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της συσκευής Soxhlet**

Η όλη διαδικασία συνεχίζεται μέχρι όλα τα εκχυλίσμα συστατικά να παραληφθούν από τον διαλύτη. Η εκχύλιση Soxhlet παρουσιάζει ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα. Καθώς το δείγμα έρχεται σε επαναλαμβανόμενη επαφή με ακόρεστο διαλύτη, μεταβάλλεται συνεχώς ο συντελεστής μεταφοράς μάζας. Παράλληλα, το δείγμα δεν έρχεται απευθείας σε επαφή με πηγή θερμότητας, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει κίνδυνος καύσης του δείγματος (De Castro & Priego-Carote, 2010).

#### **3.5.4 Προσδιορισμός ανάκτησης λιπιδίων με χρήση πράσινων διαλυτών**

Για την ανάκτηση των μικροβιακών λιπιδίων χρησιμοποιήθηκαν πράσινοι διαλύτες ως αντικαταστάτες των συμβατικών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι διαλύτες οξικός αιθυλεστέρας, 1,3-διοξολάνη και *d*-λεμονένιο σε σύγκριση με τους συμβατικούς εξάνιο και διάλυμα folch. Αρχικά, ζυγίζονται 0,4 g βιομάζας σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και τοποθετούνται σε φιαλίδιο McCartney. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 8 mL διαλύτη (5% w/v) και πραγματοποιείται έναρξη ανάδευσης σε θερμαινόμενο stirrer (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13. Ανάδευση κυττάρων για την εκχύλιση λιπιδίων με χρήση διαλύτη α. χωρίς θέρμανση και β. με θέρμανση**

Με το πέρας του κατάλληλου χρονικού διαστήματος ανάδευσης, το ομογενοποιημένο μίγμα διηθείται με την χρήση διπλού διηθητικού χαρτιού στο εσωτερικό προζυγισμένης σφαιρικής φιάλης εξάτμισης. Η σφαιρική φιάλη μεταφέρεται προς εξάτμιση υπό κενό σε περιστροφικό εξάτμιστήρα (Rotary evaporator, BUCHI, R-114) στους 50°C για την απομάκρυνση του διαλύτη. Τα λιπίδια που παραμένουν εντός της φιάλης τοποθετούνται σε φούρνο για θέρμανση στους 50°C για 30 min και έπειτα στον αφυγραντήρα μέχρι να επανέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το περιεχόμενο λίπος προσδιορίζεται από τη διαφορά του βάρους μετά την εξάτμιση και το ποσοστό λίπους υπολογίζεται με αναγωγή στο αρχικό βάρος της βιομάζας. Το ποσοστό ανάκτησης του κάθε διαλύτη ανά επέμβαση υπολογίζεται ως το βάρος των εκχυλισμένων λιπιδίων προς το συνολικό περιεχόμενο λίπος όπως αυτό προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Soxhlet, σύμφωνα με την εξίσωση

$$\text{ποσοστό ανάκτησης \%} = \frac{\text{g εκχυλισμένου λίπους}}{\text{g συνολικού περιεχόμενου λίπους}} \cdot 100$$

Κατά την πειραματική διαδικασία, εφαρμόστηκαν διαφορετικοί χρόνοι ανάδευσης (1h, 2h) σε διαφορετικές θερμοκρασίες (25°C, 40°C) για να προσδιοριστεί η ικανότητα εκχύλισης του κάθε διαλύτη. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση υπερήχων σε λουτρό (BANDELIN, SONOPLUS Ultrasonic Homogenizers) για 30 min πριν την ανάδευση για την διάτρηση των κυττάρων και η αύξηση των χρόνων

ανάδευσης (12h, 24h, 48h) και της θερμοκρασίας (60°C, 80°C) στα δείγματα. Το ποσοστό ανάκτησης υπολογίστηκε με βάση την ποσότητα λιπαρής ύλης που εκχυλίστηκε σύμφωνα με το εδάφιο 3.5.3 και όλοι οι προς μελέτη διαλύτες συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα ποσοστά ανάκτησης των συμβατικών διαλυτών.

### **3.6 Αναλυτικές μέθοδοι**

#### **3.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης της βιομάζας στηρίχθηκε στη μέτρηση της ξηρής μάζας των κυττάρων (Dry Cell Weight, DCW). Κατά τη δειγματοληψία, παραλαμβάνονται 2 mL δείγματος από το υγρό της ζύμωσης σε προζυγισμένα φιαλίδια erpendorf (με επανάληψη) και φυγοκεντρώνται με ταχύτητα 11.000 rpm για 10 min, με σκοπό το διαχωρισμό των κυττάρων. Μετά το διαχωρισμό των δύο φάσεων, το υπερκείμενο υγρό αποθηκεύεται σε φιαλίδια erpendorf για περαιτέρω ανάλυση και η βιομάζα ξεπλένεται με απιονισμένο νερό, φυγοκεντρείται εκ νέου, ξεπλένεται ξανά και μεταφέρεται για ξήρανση. Το εναιώρημα κυττάρων παραμένει σε φούρνο ξήρανσης σε σταθερή θερμοκρασία 80°C για 24 ώρες έως σταθερού βάρους των φιαλιδίων. Στη συνέχεια τα φιαλίδια τοποθετούνται σε ξηραντήρα έως ότου σταθεροποιηθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Από τη διαφορά μεταξύ απόβαρου και μικτού βάρους προκύπτει το καθαρό βάρος της ξηρής μάζας των κυττάρων και με αναγωγή της μέτρησης που ελήφθη, υπολογίζεται η τελική τιμή συγκέντρωσης ξηρής βιομάζας σε g/L.

#### **3.6.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πηγής άνθρακα**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πηγών άνθρακα στο υγρό της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) με το σύστημα SHIMADZU UFLC XR. Ο διαχωρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με στήλη Rezex ROA-Organic H<sup>+</sup> και ανιχνευτή Shimadzu RI. Η ταυτοποίηση των διάφορων χημικών ενώσεων βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά πρότυπα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> συγκέντρωσης 10mM, η ροή κατά την ανάλυση των δειγμάτων ήταν καθορισμένη στο 0,6 mL/min

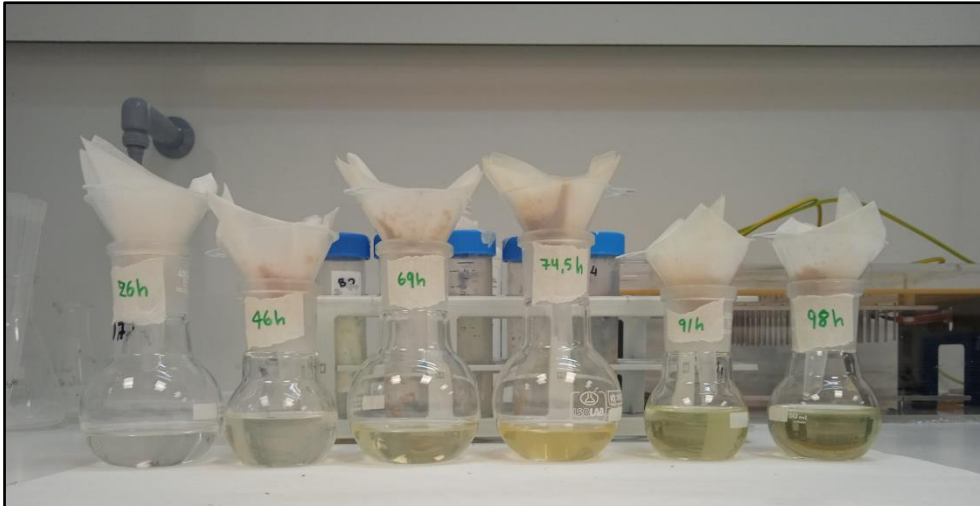
και η θερμοκρασία στήλης στους 65°C. Από τη στήλη περνούσαν 10 μL δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν ανάλογη της χρησιμοποιούμενης μεθόδου.

### **3.6.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων απαιτεί τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης της βιομάζας και την εκχύλιση του λίπους με την χρήση οργανικού διαλύτη. Αρχικά, παραλαμβάνεται δείγμα υγρής καλλιέργειας 20 mL σε προζυγισμένο φιαλίδιο (falcon) και φυγοκεντρείται με ταχύτητα 9.000 rpm για 10 min. Στη συνέχεια, ξεπλένεται με τη χρήση απιονισμένου νερού και μεταφέρεται σε λυοφιλωτή για την απομάκρυνση της υγρασίας και ζυγίζεται για τον προσδιορισμό της ξηρής βιομάζας. Το δείγμα κονιορτοποιείται και προστίθεται μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης αναλογίας 2:1 (Folch et al., 1957) για την εκχύλιση του λίπους. Έπειτα, στο δείγμα επιδρούν υπέρηχοι σε λουτρό για 30 λεπτά προκειμένου να υποβοηθηθεί η διάρρηξη των κυττάρων εξαιτίας των μεγάλων διατμητικών τάσεων που αναπτύσσονται (Araujo et al., 2013). Τέλος, το δείγμα αφήνεται σε συνθήκες σκότους για την αποφυγή της φωτο-οξειδωσης των λιπαρών οξέων για τουλάχιστον 72 ώρες.

Με το πέρας του απαραίτητου χρονικού διαστήματος, το μίγμα διηθείται με την χρήση διπλού διηθητικού χαρτιού στο εσωτερικό προζυγισμένης σφαιρικής φιάλης εξάτμισης (Εικόνα 14). Το στερεό δείγμα ξηραίνεται στον φούρνο στους 80°C και οδηγείται στον αφυγραντήρα προκειμένου να επεξεργαστεί περαιτέρω, ενώ η σφαιρική φιάλη μεταφέρεται προς εξάτμιση υπό κενό σε περιστροφικό εξάτμιστήρα στους 50°C για την εξάτμιση του πτητικού οργανικού διαλύτη. Τα λιπίδια παραμένουν εντός της κωνικής φιάλης και τοποθετούνται σε φούρνο στους 50°C για 30 min και έπειτα στον αφυγραντήρα μέχρι να επανέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τελικώς, το λίπος προσδιορίζεται βαρομετρικά από τη διαφορά του βάρους μετά την εξάτμιση. Το ποσοστό περιεχόμενου λίπους υπολογίζεται ως ο λόγος του εκχυλισμένου λίπους προς το βάρος της βιομάζας του δείγματος σύμφωνα με την εξίσωση

$$\text{ποσοστό λίπους \%} = \frac{g \text{ λίπους}}{g \text{ βιομάζας}} \cdot 100$$



**Εικόνα 14.** Διήθηση βιομάζας και μεταφορά διαλύτη σε σφαιρικές φιάλες εξάτμισης

### **3.6.4 Ποιοτικός προσδιορισμός μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων**

Ο προσδιορισμός της σύστασης των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους πραγματοποιήθηκε μέσω αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC). Η μέθοδος απαιτεί τη μετατροπή των λιπαρών οξέων σε μεθυλεστέρες (Fatty Acid Methyl Esters, FAMES), εξαιτίας της μεγαλύτερης πτητικότητας καθώς και της μικρότερης πολικότητάς τους έναντι των αντίστοιχων λιπαρών οξέων. Για την μετατροπή τους προστίθενται σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 mL 0,5 g μικροβιακού ελαίου, τα οποία είναι αποθηκευμένα σε συνθήκες κατάψυξης. Στη συνέχεια, προστίθενται 5 mL κανονικού επτανίου χρωματογραφικής καθαρότητας και 1 mL μεθανολικού διαλύματος KOH 2M. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται για 30 sec και αφήνονται σε ηρεμία για 15 min. Με το πέρας του χρόνου δημιουργούνται δύο φάσεις και από την άνω οργανική φάση όπου περιέχονται οι μεθυλεστέρες παραλαμβάνονται 0,5 mL για ανάλυση.

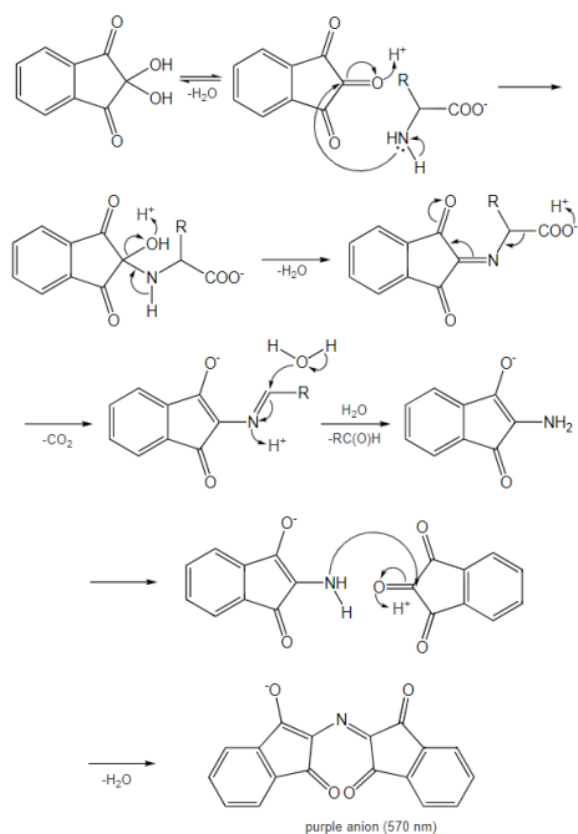
Ο προσδιορισμός των FAMES πραγματοποιήθηκε σε μηχανήμα αέριας χρωματογραφίας Shimadzu, Nexis GC-2030 εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη (AOC-20i plus) με στήλη Mega-Wax (30 m×0,25 mm, film thickness 0,25 μm MEGA Srl) και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) με χρήση ηλίου ως φέρον αέριο (1,1 mL/min). Το πρόγραμμα του φούρνου ρυθμίστηκε με αρχική θερμοκρασία 100°C. Στη συνέχεια, ο φούρνος θερμαινόταν στους 200°C με ρυθμό 5°C/λεπτό και μετά στους 245°C με ρυθμό 3°C/λεπτό όπου

παρέμεινε σταθερή για 2 λεπτά. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ρυθμίστηκε στους 250°C. Η ταυτοποίηση των FAMES έγινε με αναφορά σε πρότυπο (Supelco® 37 Component FAME Mix, 10 mg/mL σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 47885-U, Merck).

### **3.6.5 Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων – Free Amino Nitrogen (FAN)**

Για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε η φωτομετρική μέθοδος που στηρίζεται στην ποσοτικοποίηση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen-FAN) μέσω της αντίδρασής τους με τη νινυδρίνη (Lie, 1973). Η νινυδρίνη ή 2,2-διϋδροξυϊνδανο-1,3-διόνη αποτελεί οξειδωτικό παράγοντα που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτοταγών αμινών, α-αμινοξέων και αμινοτελικών άκρων πεπτιδίων και πρωτεϊνών, αφού δύναται να αντιδράσει με τις ελεύθερες αμινομάδες, αποκαρβοξυλιώνοντας τον ανθρακικό σκελετό και οδηγώντας στη δημιουργία μωβ χρωμοφόρου συμπλόκου.

Η αρχή της μεθόδου της νινυδρίνης βασίζεται στο φωτομετρικό προσδιορισμό της έντασης του χρώματος του μωβ συμπλόκου που δημιουργείται και η οποία είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων που περιέχεται στο προς ανάλυση δείγμα. Η φωτομέτρηση λαμβάνει χώρα σε μήκος κύματος 570 nm, το οποίο είναι και το μέγιστο απορρόφησης του χρωμοφόρου συμπλόκου. Κατά την πορεία της αντίδρασης, ένα μόριο νινυδρίνης το οποίο βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή αντιδρά με την διαθέσιμη αμινομάδα του αμινοξέος, στην οποία συνδέεται μέσω ενός ατόμου οξυγόνου και προκύπτει μια ιμίνη. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα αποκαρβοξυλίωση του ιμινοξέος υπό συνθήκες θέρμανσης και απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα ακολουθώντας υδρόλυση προς σχηματισμό μιας αλδεΐδης, η οποία έχει ένα άτομο άνθρακα λιγότερο από το αρχικό αμινοξύ. Στο τελευταίο στάδιο της αντίδρασης, με την προσθήκη ενός επιπλέον μορίου νινυδρίνης, παράγεται ένα μόριο 2-(1,3-διοξοϊνδαν-2-υλ)ιμινοϊνδαν-1,3-διόνης, το οποίο αποτελεί το χρωμοφόρο σύμπλοκο νινυδρίνης (Εικόνα 15).

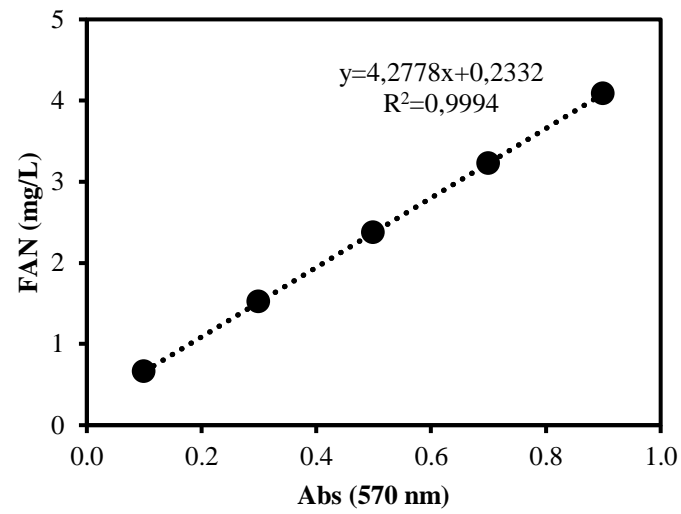


**Εικόνα 15. Μηχανισμός αντίδρασης νινυδρίνης με ελεύθερη αμινομάδα προς παραγωγή έγχρωμου συμπλόκου**

Για την υλοποίηση της μεθόδου, σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος, 0,5 mL αντιδραστήριου χρώσης (Color Reagent: 49,71 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5 g νινυδρίνης, 3 g φρουκτόζη ως αναγωγική ουσία, 60 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> για ρύθμιση pH και συμπλήρωση μέχρι το 1L με dH<sub>2</sub>O). Το μίγμα αναδεύεται καλά σε vortex, οι σωλήνες πωματίζονται και οδηγούνται προς βρασμό για 16 λεπτά. Ακολουθεί ψύξη σε παγόλουτρο για 20 λεπτά και προσθήκη αντιδραστήριου αραιώσης (αντιδραστήριο αραιώσης-FAN Dilution: 2 g KIO<sub>3</sub> διαλύονται σε 616 mL dH<sub>2</sub>O και συμπλήρωση μέχρι το 1L με αιθανόλη). Το μίγμα αναδεύεται στο vortex για 20 sec και στη συνέχεια φωτομετρείται σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-Vis (Jasco V-530) στα 570 nm. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται 1 mL απιονισμένου νερού, ενώ η διαδικασία πραγματοποιείται δύο φορές για κάθε δείγμα. Η συγκέντρωση του δείγματος σε άζωτο υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας πρότυπο



διάλυμα γλυκίνης (Σχήμα 1). Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε άζωτο εκφράστηκε σε mg/L FAN με βάση την καμπύλη αναφοράς.



**Σχήμα 1. Καμπύλη αναφοράς της μεθόδου FAN**

## 4. Αποτελέσματα και συζήτηση

### 4.1 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση οργανικών οξέων προς παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις

Για την βιοτεχνολογική αξιοποίηση των οργανικών οξέων πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες με τη χρήση των τριών ελαιογόνων μικροοργανισμών που έχουν αναφερθεί. Αρχικά, οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα με χαμηλή συγκέντρωση της εκάστοτε πηγής άνθρακα με σκοπό τη μελέτη της κατανάλωσής της. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οργανικών οξέων για την ανάπτυξη και την συσσώρευση μικροβιακού λίπους. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση 1 g/L και βακτηριολογική πεπτόνη σε συγκέντρωση 2 g/L.

Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι οι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 είναι ικανοί να αναπτύσσονται και να συσσωρεύσουν μικροβιακά λιπίδια σε όλα τα προς μελέτη οργανικά οξέα. Αντίθετα, το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-27012 φάνηκε ικανό να αναπτύσσεται μόνο σε υπόστρωμα με βάση το οξικό οξύ. Η παραγωγή λιπιδίων κυμαίνεται σε τιμές 2,47-3,90 g/L, με τη μέγιστη παραγωγή να παρατηρείται στην περίπτωση της ζύμωσης με οξικό οξύ με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509. Οι καλλιέργειες με τη χρήση οξικού και γαλακτικού οξέος παρουσίασαν υψηλή απόδοση (0,15-0,22 g/g) και παραγωγικότητα λιπιδίων (0,16-0,23 g/(L·h)) ενώ στην περίπτωση του ηλεκτρικού οξέος, παρότι η απόδοση των δύο στελεχών κυμαίνεται από 0,21-0,24 g/g, η παραγωγικότητά τους παρουσιάζει χαμηλές τιμές (<0,06 g/(L·h)). Οι ζυμώσεις με κροτονικό οξύ στο μέσο δεν κατέγραψαν υψηλές αποδόσεις, με τους μικροοργανισμούς να μην καταναλώνουν υποστρώματα με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 5 g/L. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ασυνεχών ζυμώσεων για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και της αντίστοιχης απόδοσης και παραγωγικότητας με τη χρήση εμπορικών οργανικών οξέων.

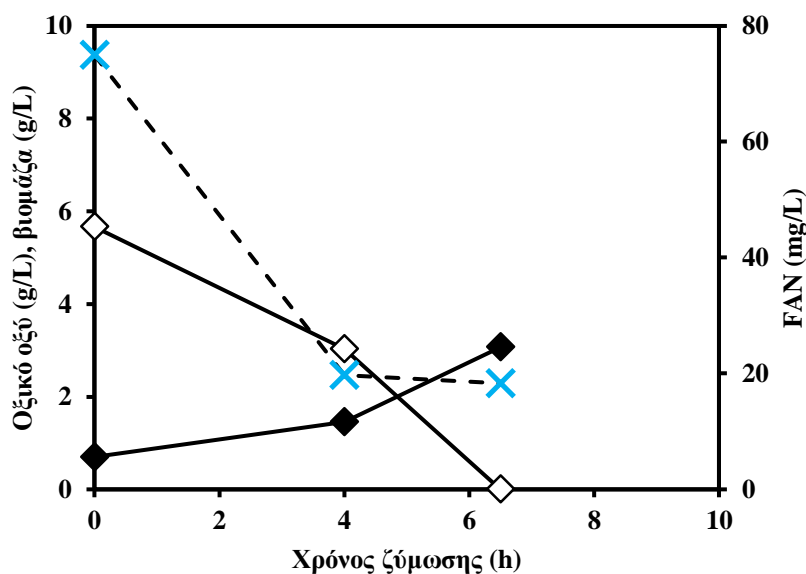
**Πίνακας 2. Συνοπτικά αποτελέσματα της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων από διαφορετικούς μικροοργανισμούς και διαφορετικές πηγές άνθρακα**

| Αρχική πηγή άνθρακα     | Μικροοργανισμός                   | Βιομάζα (g/L) | Λίπος (g/L) | Περιεκτικότητα σε λίπος (%) | Απόδοση (g/g) | Παραγωγικότητα (g/(L·h)) |
|-------------------------|-----------------------------------|---------------|-------------|-----------------------------|---------------|--------------------------|
| Οξικό οξύ<br>6 g/L      | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509     | 3,07          | 0,91        | 29,64                       | 0,15          | 0,15                     |
|                         | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296      | 3,07          | 0,79        | 25,73                       | 0,13          | 0,13                     |
|                         | <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012 | 3,58          | 0,52        | 14,53                       | 0,09          | 0,06                     |
| Οξικό οξύ<br>18 g/L     | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509     | 7,43          | 3,90        | 52,60                       | 0,22          | 0,23                     |
|                         | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296      | 6,89          | 3,20        | 46,80                       | 0,18          | 0,19                     |
|                         | <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012 | 6,83          | 2,47        | 36,00                       | 0,13          | 0,07                     |
| Γαλακτικό οξύ<br>10 g/L | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509     | 5,63          | 1,36        | 24,15                       | 0,13          | 0,11                     |
|                         | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296      | 4,50          | 1,27        | 28,10                       | 0,12          | 0,11                     |
|                         | <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012 |               |             | Δεν καταναλώθηκε            |               |                          |
| Γαλακτικό οξύ<br>20 g/L | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509     | 7,20          | 3,47        | 48,46                       | 0,15          | 0,20                     |
|                         | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296      | 7,83          | 3,32        | 42,32                       | 0,16          | 0,16                     |
|                         | <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012 |               |             | Δεν καταναλώθηκε            |               |                          |
| Ηλεκτρικό οξύ<br>8 g/L  | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509     | 5,08          | 1,80        | 35,67                       | 0,21          | 0,06                     |
|                         | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296      | 5,45          | 1,88        | 34,40                       | 0,22          | 0,06                     |
|                         | <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012 |               |             | Δεν καταναλώθηκε            |               |                          |
| Ηλεκτρικό οξύ<br>17 g/L | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509     | 7,90          | 3,01        | 39,29                       | 0,24          | 0,04                     |
|                         | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296      | 7,85          | 2,87        | 36,68                       | 0,23          | 0,04                     |
|                         | <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012 |               |             | Δεν καταναλώθηκε            |               |                          |

|   |                                   |      |      |       |      |                  |
|---|-----------------------------------|------|------|-------|------|------------------|
| Κροτονικό οξύ 5 g/L +<br>Γλυκόζη 5 g/L  | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509     | 4,56 | 0,66 | 14,52 | 0,07 | 0,03             |
|   | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296      | 5,05 | 1,04 | 20,79 | 0,11 | 0,04             |
|   | <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012 |      |      |       |      | Δεν καταναλώθηκε |
| Κροτονικό οξύ 10 g/L<br>+ Γλυκόζη 5 g/L | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509     |      |      |       |      | Δεν καταναλώθηκε |
|   | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296      |      |      |       |      | Δεν καταναλώθηκε |
|   | <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012 |      |      |       |      | Δεν καταναλώθηκε |

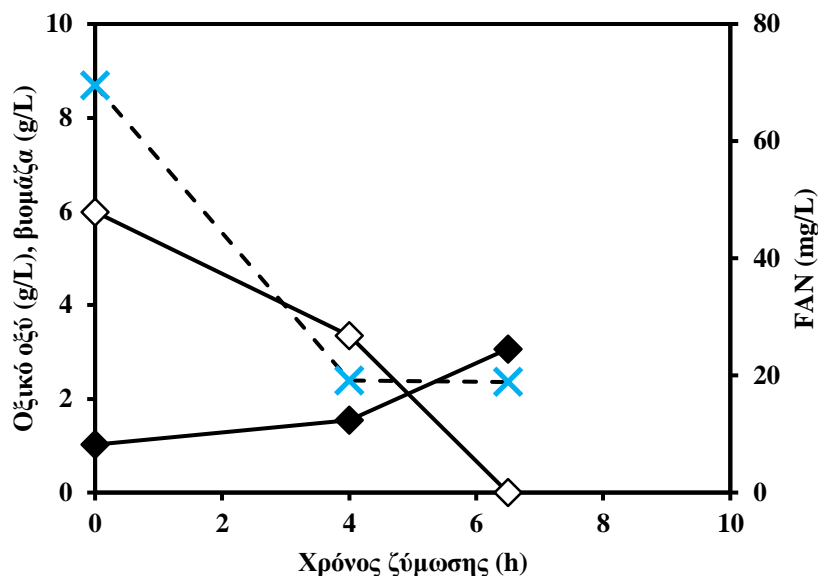
#### 4.1.1 Ασυνεχείς ζυμώσεις με οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα

Κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509 με χρήση οξικού οξέος ως μοναδική πηγή άνθρακα, η αρχική συγκέντρωση των 5,67 g/L καταναλώθηκε πλήρως στις 6,5 ώρες από την έναρξη της ζύμωσης και η παραγωγή βιομάζας ανήλθε σε 3,07 g/L. Η αρχική συγκέντρωση ελεύθερων αμινομάδων ήταν 75 mg/L και καταναλώθηκαν μέχρι και τα 18,3 mg/L στο τέλος της ζύμωσης. Το στέλεχος παρήγαγε 0,91 g/L μικροβιακό λίπος με περιεκτικότητα 29,64% w/w. Η απόδοση της καλλιέργειας ήταν 0,15 g λιπιδίων ανά g καταναλωθέντος οξικού οξέος, με παραγωγικότητα 0,15 g/(L·h) (Σχήμα 2).



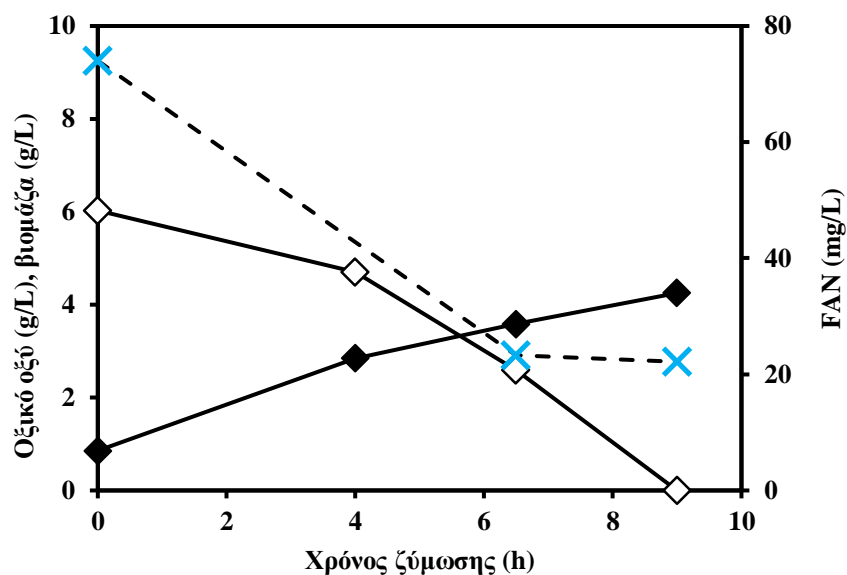
**Σχήμα 2.** Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 6 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509

Ομοίως, στην περίπτωση του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296, το οξικό οξύ αρχικής συγκέντρωσης 5,99 g/L καταναλώθηκε σε 6,5 ώρες από την έναρξη της καλλιέργειας, με την παραγωγή βιομάζας να ανέρχεται στα 3,07 g/L. Το FAN αρχικής συγκέντρωσης 69,5 mg/L καταναλώθηκε μέχρι τα 18,9 mg/L (Σχήμα 3). Η παραγωγή λίπους ήταν 0,79 g/L, καταλαμβάνοντας το 25,73% της ξηρής βιομάζας. Η απόδοση ανήλθε στα 0,13 g/g και η παραγωγικότητα στα 0,13 g/(L·h).



**Σχήμα 3.** Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 6 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296

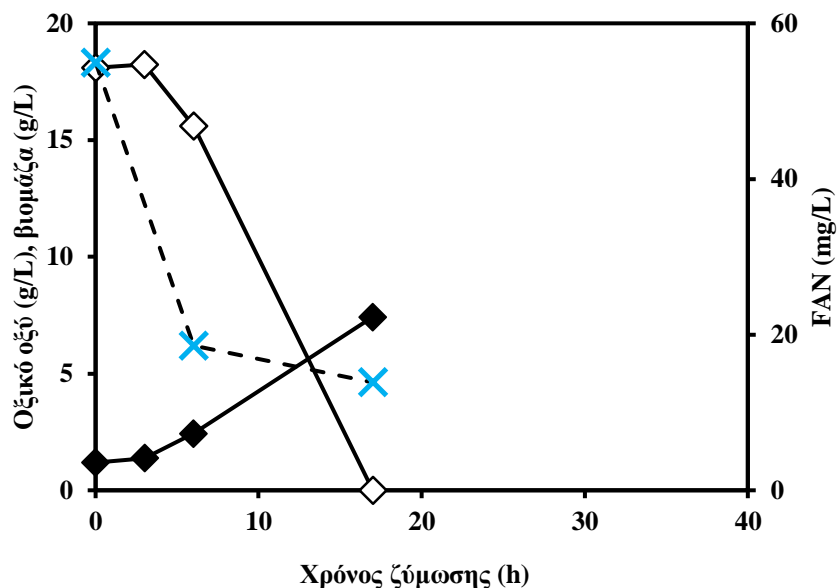
Ο μικροοργανισμός *R. toruloides* NRRL Y-27012 κατέγραψε παραγωγή βιομάζας και λίπους 3,58 g/L και 0,52 g/L αντίστοιχα, με αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος 6,03 g/L το οποίο καταναλώθηκε μετά από 9 ώρες καλλιέργειας. Η απόδοση των παραχθέντων λιπιδίων ήταν 0,09 g/g, η παραγωγικότητα 0,06 g/(L·h) και η περιεκτικότητά σε μικροβιακό λίπος 14,53% w/w. Η αρχική συγκέντρωση ελεύθερων αμινομάδων ήταν 74 mg/L και καταναλώθηκε μέχρι τα 22,2 mg/L (Σχήμα 4).



**Σχήμα 4.** Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 6 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *R. toruloides* NRRL Y-27012

Στη συνέχεια, οι μικροοργανισμοί υποβλήθηκαν σε ζυμώσεις με αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος 18 g/L και όμοια τροφοδοσία πηγής αζώτου με σκοπό την μελέτη της επίδρασης της εν λόγω πηγής άνθρακα και της πιθανής παρεμπόδισης της ανάπτυξης των ζυμών λόγω υψηλότερης αρχικής συγκέντρωσης.

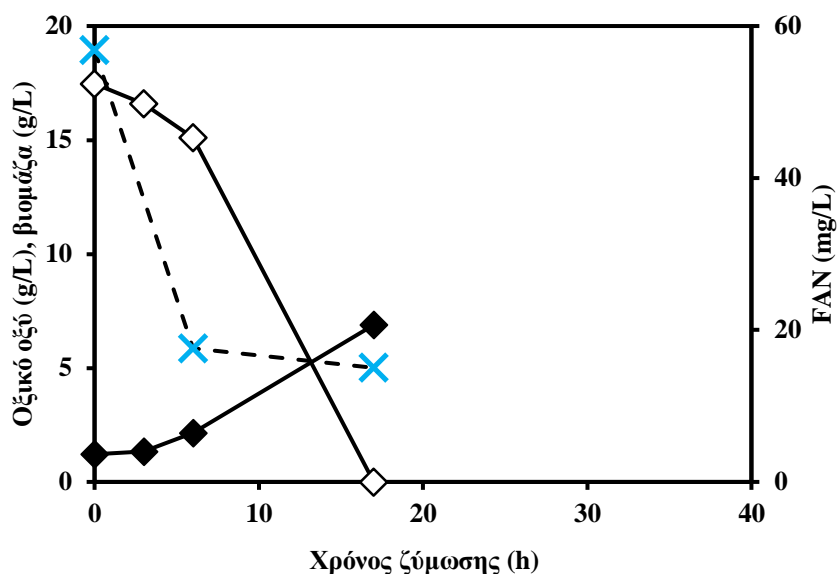
Η καλλιέργεια του *C. curvatus* ATCC 20509 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση οξικού 18,11 g/L παράγαγε βιομάζα συγκέντρωσης 7,43 g/L καταναλώνοντας πλήρως την πηγή άνθρακα μετά από 17 ώρες. Η συγκέντρωση του FAN από 55 mg/L μειώθηκε σε 13,9 mg/L στο τέλος της ζύμωσης. Η παραγωγή λίπους ανήλθε στα 3,9 g/L αποτελώντας το 52,6% της ξηρής βιομάζας. Η απόδοση της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων προς την πηγή άνθρακα ήταν 0,22 g/g με ρυθμό παραγωγής 0,23 g/(L·h) (Σχήμα 5).



**Σχήμα 5.** Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 18 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509

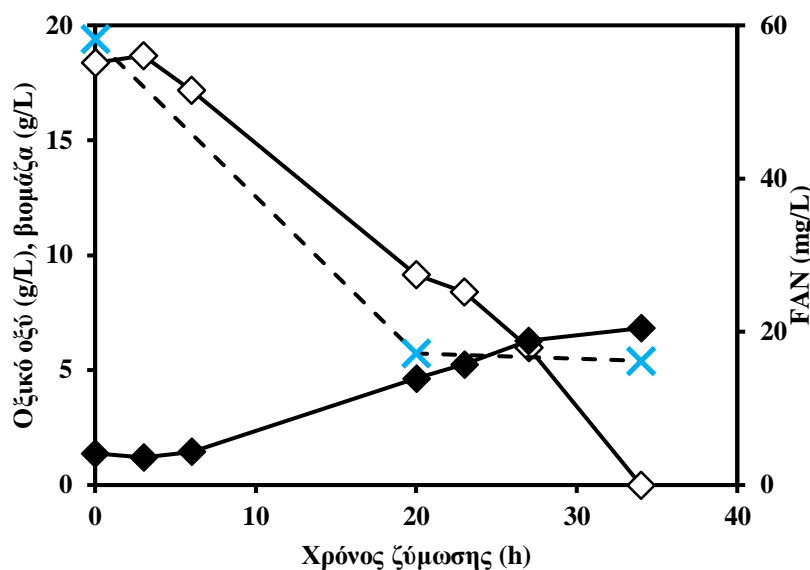
Στο Σχήμα 6 παρουσιάζεται η ζύμωση για το στέλεχος *L. starkeyi* DSM 70296 με αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος που προσδιορίστηκε στα 17,47 g/L. Για την πλήρη κατανάλωση του υποστρώματος χρειάστηκαν 17 ώρες με την συγκέντρωση της βιομάζας να ανέρχεται στα 6,89 g/L. Το FAN καταναλώθηκε έως τα 15 mg/L από αρχική συγκέντρωση 56,6 g/L και η παραγωγή λίπους έφτασε τα 3,20 g/L με λιποπεριεκτικότητα 46,8% w/w. Η απόδοση της ζύμωσης ανήλθε στα 0,18 g/g με παραγωγικότητα 0,19 g/(L·h).





**Σχήμα 6.** Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 18 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296

Στην αντίστοιχη ζύμωση του *R. toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος 18,38 g/L, η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε ικανοποιητικά ύστερα από 34 ώρες ζύμωσης, ενώ το FAN (58,2 mg/L) καταναλώθηκε έως τη συγκέντρωση των 16,2 mg/L. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε στα 6,83 g/L και η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού λίπους στα 2,47 g/L. Η απόδοση παραγωγής προϊόντος ήταν 0,13 g/g και η παραγωγικότητα 0,07 g/(L·h) με λιποπεριεκτικότητα ίση με 36% w/w. (Σχήμα 7).



**Σχήμα 7. Κατανάλωση οξικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 18 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *R. toruloides* NRRL Y-27012**

Όσον αφορά τη χρήση του οξικού οξέος ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, οι Gong et al. (2015) πραγματοποίησαν ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες με διαφορετικά στελέχη ελαιογόνων ζυμών με το οξικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα. Η καλλιέργεια με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* απέδωσε παραγωγή βιομάζας 5,7 g/L με περιεκτικότητα λίπους 73,4%, όταν η αρχική συγκέντρωση οξικού ήταν 30 g/L. Στις ίδιες συνθήκες, ο *R. toruloides* Y4 είχε λιποπεριεκτικότητα 54,9% στα 2,6 g/L βιομάζας ενώ σε αρχική συγκέντρωση 5 g/L, οι *R. toruloides* ATCC 10788 και *L. starkeyi* AS 21560 συσσωρεύουν λιπίδια της τάξης των 33% και 17,1% αντίστοιχα. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη ο *C. curvatus* υποβλήθηκε και σε ασυνεχή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, με την βιομάζα να ανέρχεται σε υψηλότερη συγκέντρωση (8,0 g/L) αλλά με χαμηλότερη λιποπεριεκτικότητα (49,9%). Σε αντίθεση με την παρούσα εργασία, η συγκέντρωση της βιομάζας δεν ανήλθε σε υψηλά επίπεδα στις ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες, με τα παραγόμενα κύτταρα όμως να συσσωρεύουν ικανοποιητικά ποσοστά λίπους. Αυτό πιθανώς συμβαίνει λόγω χαμηλής αρχικής συγκέντρωσης πηγής αζώτου, καθώς στην υπό σχολιασμό μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 0,5 g/L εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνης αντίστοιχα. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται βιβλιογραφική ανασκόπηση ασυνεχών ζυμώσεων με τη χρήση οξικού οξέος ως πηγή άνθρακα.

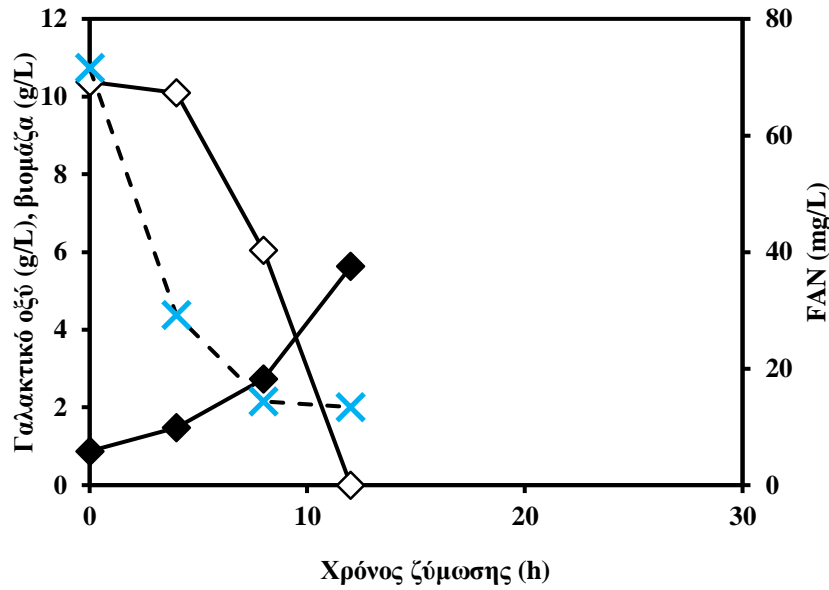
**Πίνακας 3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων με οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα σε ασυνεχείς ζυμώσεις**

| Μικροοργανισμός                 | Αρχική συγκέντρωση (g/L) | Βιομάζα (g/L) | Περιεκτικότητα σε λίπος (%) | Αναφορά              |
|---------------------------------|--------------------------|---------------|-----------------------------|----------------------|
| <i>C. curvatus</i> ATCC 20509   | 20                       | 2,8           | 37,2                        | Zheng et al. (2012)  |
| <i>C. curvatus</i> ATCC 20509   | 30                       | 5,7           | 73,4                        | Gong et al. (2015)   |
| <i>C. curvatus</i> ATCC 20509   | 30                       | 7,2           | 58                          | Liu et al. (2017)    |
| <i>C. curvatus</i> ATCC 20509   | 20                       | 8,0           | 41,3                        | Lian et al. (2012)   |
| <i>C. curvatus</i> ATCC 20509   | 30                       | 8,0           | 49,9                        | Gong et al. (2015)   |
| <i>C. curvatus</i> MUCL 29819   | 40                       | 7,0           | 71,7                        | Huang et al. (2018)  |
| <i>L. starkeyi</i> DSM70296     | 3                        | 0,9           | 28,4                        | Xavier et al. (2017) |
| <i>L. starkeyi</i> AS 21560     | 5                        | 3,2           | 17,1                        | Gong et al. (2015)   |
| <i>R. toruloides</i> AS 21389   | 20                       | 4,4           | 48,2                        | Huang et al. (2016)  |
| <i>R. toruloides</i> ATCC 10788 | 5                        | 1,2           | 33,0                        | Gong et al. (2015)   |
| <i>R. toruloides</i> Y4         | 30                       | 2,6           | 54,9                        | Gong et al. (2015)   |

#### 4.1.2 Ασυνεχείς ζυμώσεις με γαλακτικό οξύ ως πηγή άνθρακα

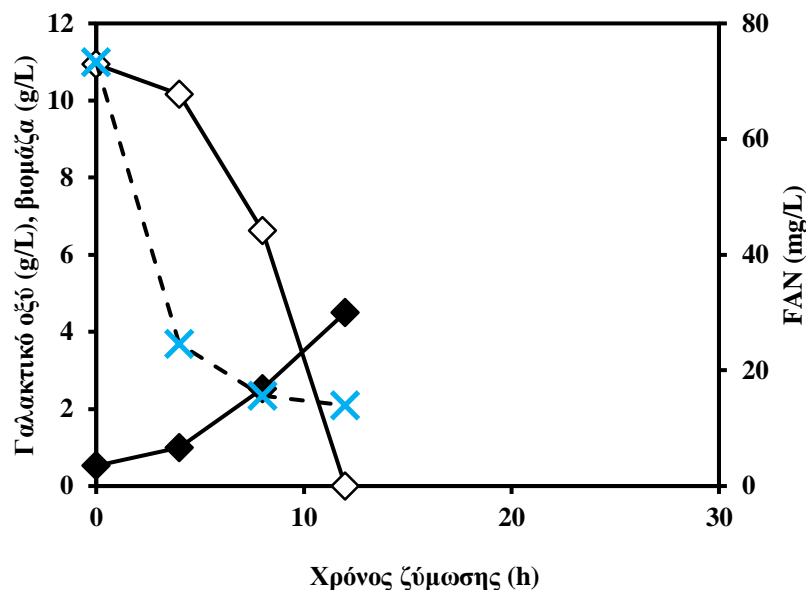
Στη συνέχεια, οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το γαλακτικό οξύ. Αρχικά, οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με αρχική συγκέντρωση γαλακτικού οξέος της τάξης των 10 g/L και κατάλληλης σύστασης πηγών αζώτου για τις ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες.

Ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 κατανάλωσε πλήρως το γαλακτικό οξύ σε 12 ώρες ζύμωσης με τελική συγκέντρωση βιομάζας 5,63 g/L και ενδοκυτταρικού λίπους 1,36 g/L. Η συγκέντρωση του FAN από 71,5 mg/L έφτασε 13,4 mg/L στο τέλος της καλλιέργειας. Η απόδοση παραγωγής λίπους ήταν 0,13 g ανά g γαλακτικού οξέος, η λιποπεριεκτικότητα 24,15% w/w και η παραγωγικότητα 0,11 g/(L·h) (Σχήμα 8).



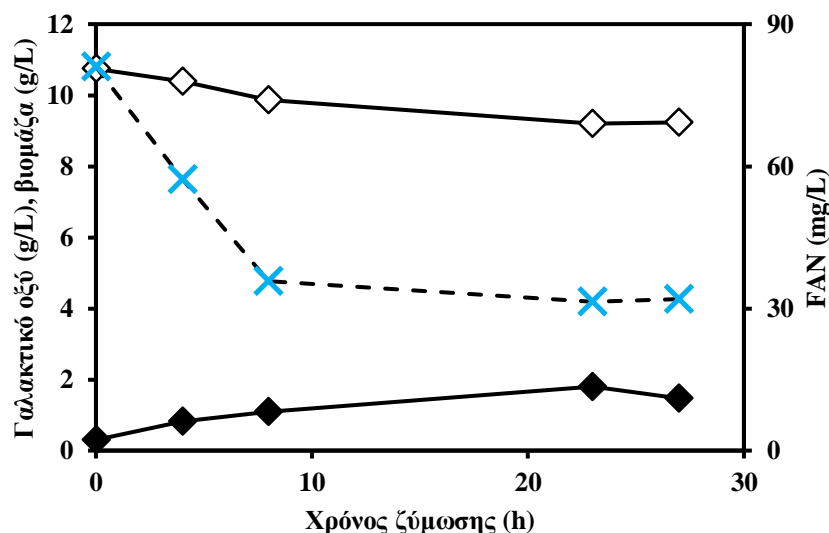
**Σχήμα 8.** Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. Curvatus* ATCC 20509

Στην ίδια ζύμωση που διενεργήθηκε στο στέλεχος *L. starkeyi* DSM 70296, η αρχική ποσότητα γαλακτικού οξέος συγκέντρωσης 10,94 g/L καταναλώθηκε εντός 12 ωρών με τελική συγκέντρωση παραγόμενης βιομάζας και λίπους 4,5 g/L και 1,27 g/L αντίστοιχα. Τα 73,3 mg/L FAN καταναλώθηκαν έως τα 13,9 mg/L στο τέλος της ζύμωσης. Η λιποπεριεκτικότητα των κυττάρων ανήλθε σε 28,10% w/w, η απόδοση παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων στα 0,12 g/g και η παραγωγικότητα της ζύμωσης στα 0,11 g/(L·h) (Σχήμα 9).



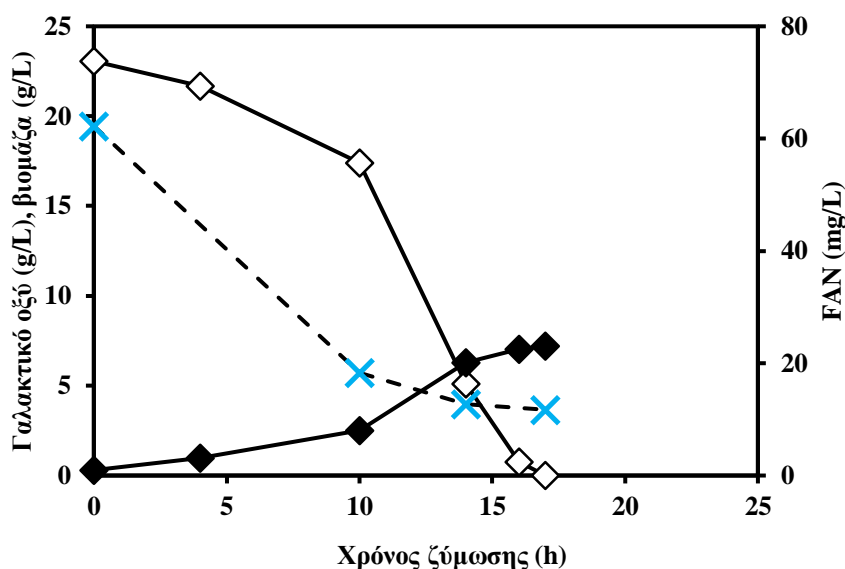
**Σχήμα 9.** Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296

Ο μικροοργανισμός *R. toruloides* NRRL Y-27012 (Σχήμα 10) δεν κατανάλωσε το περιεχόμενο στο μέσο της ζύμωσης γαλακτικό οξύ και δεν μελετήθηκε περαιτέρω όσον αφορά την ανάπτυξή του σε μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση της εν λόγω πηγής άνθρακα.



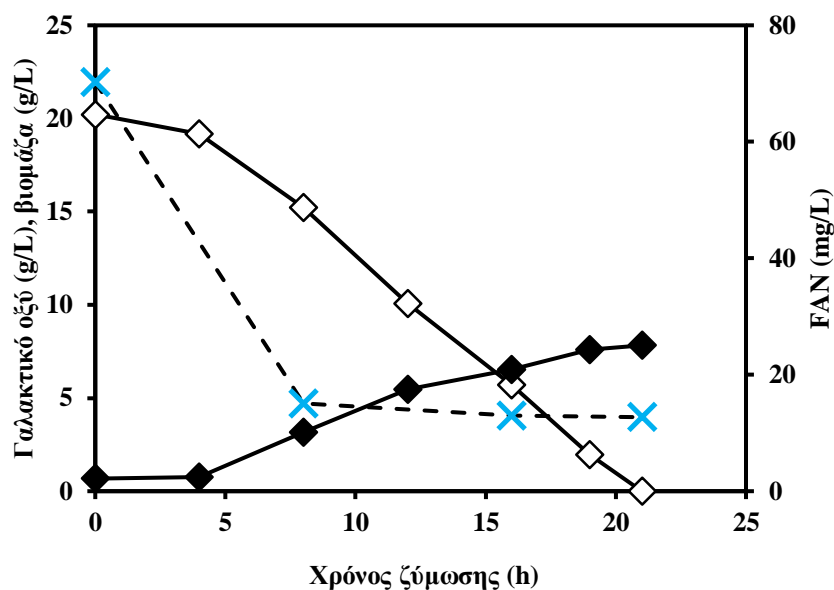
**Σχήμα 10.** Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *R. toruloides* NRRL Y-27012

Στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με γαλακτικό οξύ με αρχική συγκέντρωση 23,06 g/L στο μέσο, η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε από τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509 σε 17 ώρες. Η αρχική συγκέντρωση FAN ήταν 62,2 mg/L και έφτασε στα 11,7 mg/L. Η παραγωγή βιομάζας ανήλθε στα 7,2 g/L και η αντίστοιχη των ενδοκυτταρικών λιπιδίων στα 3,47 g/L με ποσοστό λίπους 48,46% w/w (Σχήμα 11). Η απόδοση παραγωγής λιπιδίων ήταν 0,15 g/g και η παραγωγικότητά της 0,20 g/(L·h).



**Σχήμα 11. Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. Curvatus* ATCC 20509**

Στην αντίστοιχη ζύμωση με τον *L. starkeyi* DSM 70296 (Σχήμα 12), η παραγωγή βιομάζας υπολογίστηκε στα 7,83 g/L και το ενδοκυτταρικό λίπος στα 3,32 g/L έπειτα από την κατανάλωση 20,22 g/L γαλακτικού οξέος σε 21 ώρες. Η απόδοση λιπιδίων ήταν 0,16 g/g, η παραγωγικότητα 0,16 g/(L·h) και το ποσοστό λίπους 42,32% w/w. Το FAN (70,3 mg/L) καταναλώθηκε τις πρώτες 8 ώρες της ζύμωσης και παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα (12,7 mg/L) έως την πλήρη κατανάλωση της πηγής άνθρακα.

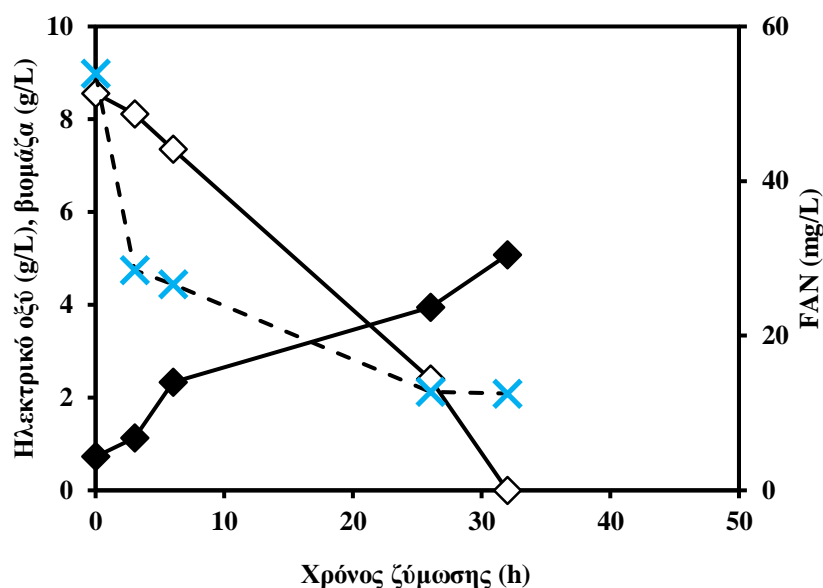


**Σχήμα 12. Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296**

#### **4.1.3 Ασυνεχείς ζυμώσεις με ηλεκτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα**

Οι ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες με το ηλεκτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα πραγματοποιήθηκαν με αρχικές συγκεντρώσεις 8 g/L και 17 g/L για κάθε εξεταζόμενο μικροοργανισμό.

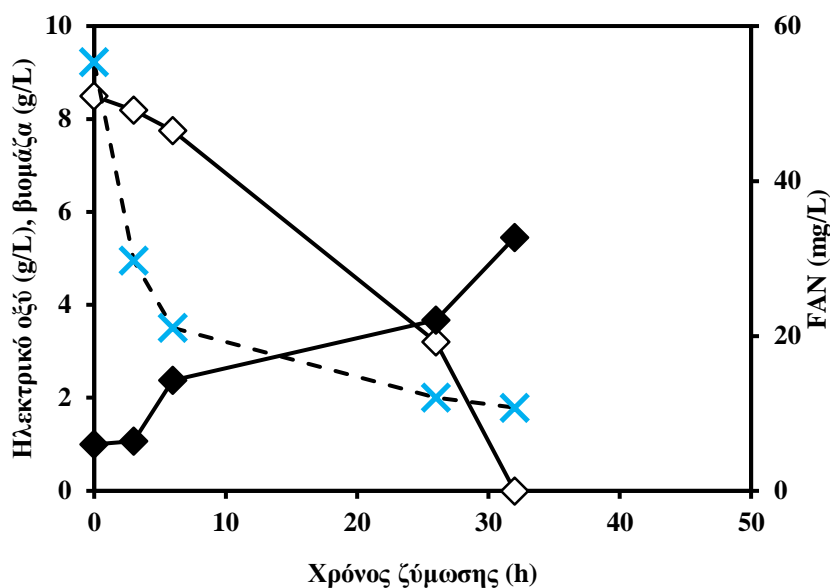
Στην καλλιέργεια με το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509, το ηλεκτρικό οξύ αρχικής συγκέντρωσης 8,56 g/L καταναλώθηκε πλήρως μετά από 32 ώρες, με παραγωγή βιομάζας και λίπους που ανήλθε σε 5,08 g/L και 1,8 g/L αντίστοιχα. Τα 53,91 mg/L FAN καταναλώνονταν έως τις 26 ώρες ζύμωσης, με την τιμή να καταλήγει στα 12,52 mg/L μέχρι την πλήρη κατανάλωση της πηγής άνθρακα (Σχήμα 13). Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε λίπος ήταν 35,67% w/w, η απόδοση λίπους 0,21 g/g και η παραγωγικότητα 0,06 g/(L·h).



**Σχήμα 13.** Κατανάλωση ηλεκτρικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 8 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. Curvatus* ATCC 20509

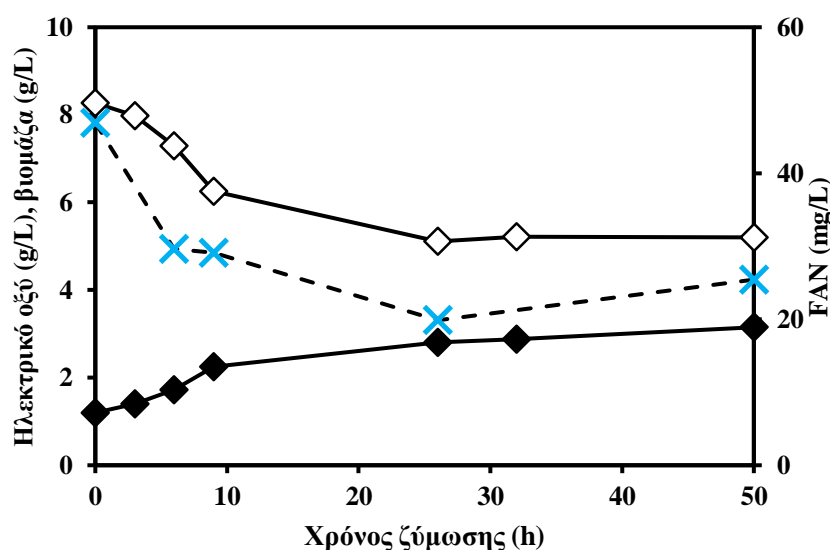
Στο Σχήμα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ζύμωσης για το στέλεχος *L. starkeyi* DSM 70296 με αρχική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος 8,49 g/L. Για την πλήρη κατανάλωσή του χρειάστηκαν 32 ώρες ζύμωσης, η συγκέντρωση του μικροβιακού λίπους έφτασε στα 1,88 g/L με αντίστοιχη συγκέντρωση βιομάζας στα 5,45 g/L, που αντιστοιχεί σε 34,40% λιποπεριεκτικότητα. Η απόδοση παραγωγής ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους έφτασε στα 0,22 g λίπους ανά g ηλεκτρικού οξέος και η παραγωγικότητα στα 0,06 g/(L·h). Το FAN του μέσου συγκέντρωσης 53,3 mg/L καταναλώθηκε έως τα 10,7 mg/L.





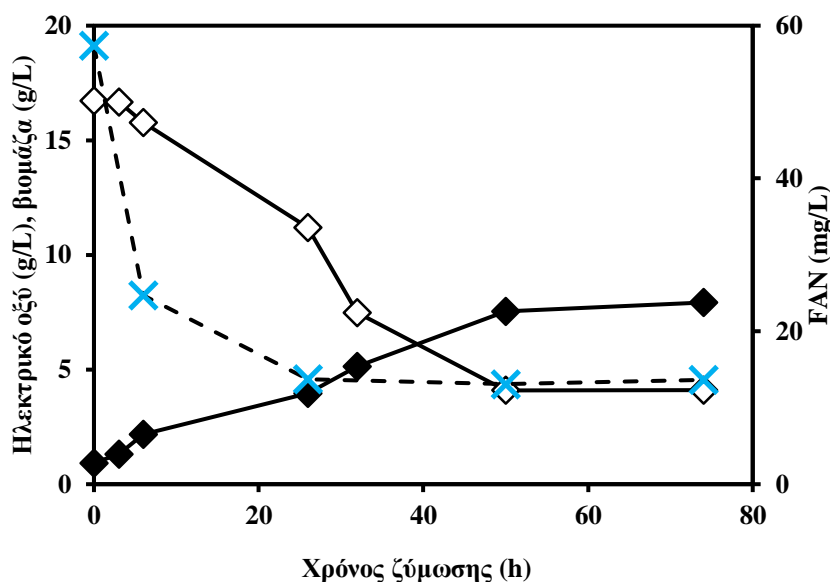
**Σχήμα 14.** Κατανάλωση ηλεκτρικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 8 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296

Ο μικροοργανισμός *R. toruloides* NRRL Y-27012 (Σχήμα 15) κατανάλωσε το περιεχόμενο στο μέσο της ζύμωσης ηλεκτρικό οξύ (8,27 g/L) έως ότου η τιμή του φτάσει τα 5,20 g/L. Στη συνέχεια, και αφού το FAN καταναλώθηκε (19,9 mg/L), η κατανάλωση της πηγής άνθρακα σταμάτησε μετά από 50 ώρες ζύμωσης.



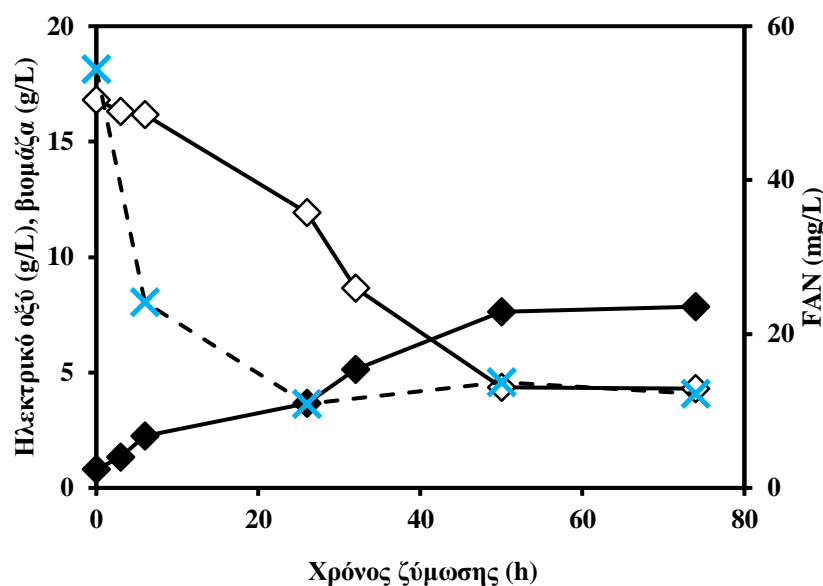
**Σχήμα 15.** Κατανάλωση ηλεκτρικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 8 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *R. toruloides* NRRL Y-27012

Στην αντίστοιχη ζύμωση με τον *C. curvatus* ATCC 20509 με μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος (16,72 g/L), παρατηρήθηκε κατανάλωση της πηγής άνθρακα όσο υπήρχε ικανοποιητική ποσότητα FAN (Σχήμα 16). Συγκεκριμένα, το ηλεκτρικό οξύ καταναλώθηκε έως τα 4,09 g/L σε 50 ώρες ζύμωσης και στη συνέχεια τερματίστηκε η χρησιμοποίησή του από τον μικροοργανισμό. Το FAN αρχικής συγκέντρωσης 57,4 mg/L έφτασε τα 13,1 mg/L στις αντίστοιχες ώρες έως ότου σταθεροποιηθεί η συγκέντρωσή του στο μέσο. Η παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων μετά από 74 ώρες ανήλθε σε 7,93 g/L και 3,01 g/L αντίστοιχα, με λιποπεριεκτικότητα 39,29% w/w. Η απόδοση λίπους υπολογίστηκε στα 0,24 g/g και η παραγωγικότητα στα 0,04 g/(L·h).



**Σχήμα 16. Κατανάλωση ηλεκτρικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 17 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. Curvatus* ATCC 20509**

Αντίστοιχη πορεία πραγματοποιήθηκε και στην ζύμωση με τον *L. starkeyi* DSM 70296 με αρχική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος 16,82 g/L, όπου αυτό καταναλώθηκε έως τα 4,37 g/L στις 50 ώρες από την έναρξη της ζύμωσης. Η τελική συγκέντρωση βιομάζας ήταν 7,85 g/L και το FAN αρχικής συγκέντρωσης 54,4 mg/L έμεινε σταθερό στα 12,2 mg/L από την 26<sup>η</sup> ώρα μέχρι και την τελευταία μέτρηση στις 74 ώρες (Σχήμα 17). Το παραγόμενα ενδοκυτταρικά λιπίδια προσδιορίστηκαν στα 2,87 g/L, όπου αποτελούσαν το 36,68% της βιομάζας. Η απόδοσή τους ήταν 0,23 g/g και η παραγωγικότητα 0,04 g/(L·h).

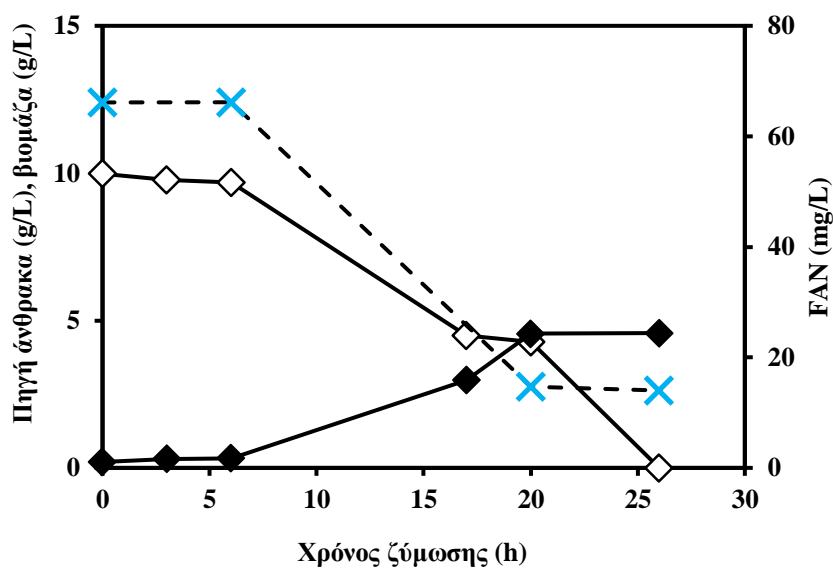


**Σχήμα 17. Κατανάλωση ηλεκτρικού οξέος (◇) αρχικής συγκέντρωσης 17 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296**

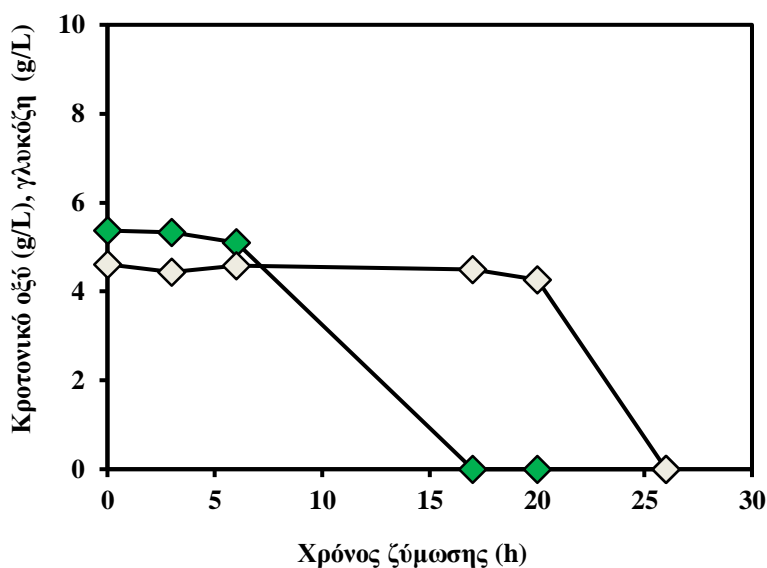
#### 4.1.4 Ασυνεχείς ζυμώσεις με κροτονικό οξύ ως πηγή άνθρακα

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε ασυνεχείς ζυμώσεις με κροτονικό οξύ, το οποίο αποτελεί μονομερές του βιοαποικοδομήσιμου πολύ (3-υδρόξυ-βουτυρικού) και μπορεί να παραχθεί κατά την διαδικασία της αποδόμησής του. Οι ζυμώσεις που έλαβαν χώρα είχαν ως θρεπτικό μέσο συνθετική πηγή κροτονικού οξέος σε συγκεντρώσεις 5 g/L και 10 g/L σε συνδυασμό με 5 g/L γλυκόζη.

Κατά την καλλιέργεια του *C. curvatus* ATCC 20509 στο εν λόγω μέσο με συγκέντρωση 5,37 g/L κροτονικού οξέος και 4,61 g/L γλυκόζης, η πρώτη πηγή καταναλώθηκε εντός 20 ωρών ενώ η δεύτερη άρχισε να καταναλώνεται μετά την πλήρη κατανάλωση της πρώτης. Η γλυκόζη καταναλώθηκε πλήρως 6 ώρες μετά την πλήρη κατανάλωση του κροτονικού οξέος με τελική παραγωγή βιομάζας 4,56 g/L. Τα παραγόμενα λιπίδια υπολογίστηκαν στα 0,66 g/L αποτελώντας το 14,52% των κυττάρων, με απόδοση ζύμωσης 0,07 g/g και παραγωγικότητα 0,03 g/(L·h). Τα 66,11 mg/L FAN άρχισαν να καταναλώνονται στις 6 ώρες από την έναρξη της ζύμωσης και σταμάτησαν (14,7 mg/L) μετά από 20 ώρες. Η πορεία της ζύμωσης αποτυπώνεται στο Σχήμα 18 και η κατανάλωση των επιμέρους πηγών άνθρακα στο Σχήμα 19.



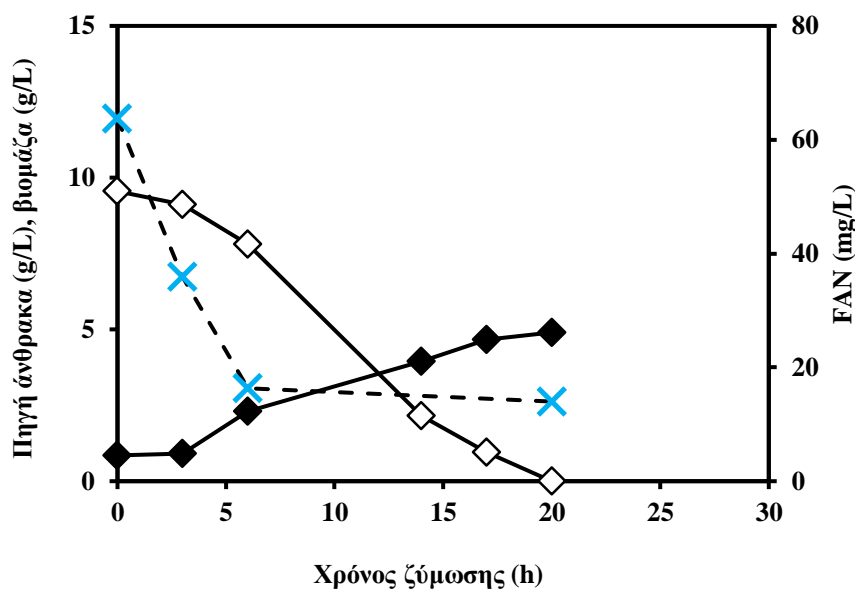
Σχήμα 18. Κατανάλωση πηγών άνθρακα (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. Curvatus* ATCC 20509



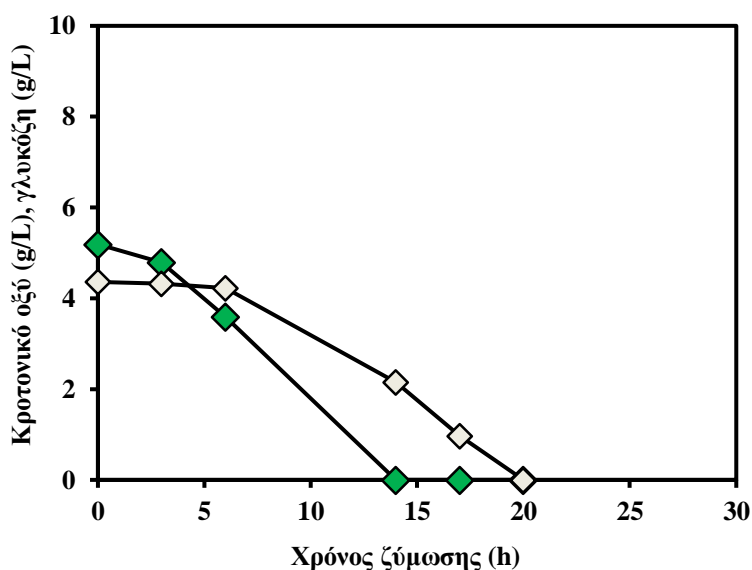
Σχήμα 19. Κατανάλωση 5 g/L κροτονικού οξέος (◆) και 5 g/L γλυκόζης (◇) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. Curvatus* ATCC 20509

Σε ίδια σύσταση του μέσου ζύμωσης, ο μικροοργανισμός *L. starkeyi* DSM 70296 κατανάλωσε πλήρως τις πηγές άνθρακα σε 20 ώρες και παρήγαγε βιομάζα 4,9 g/L (Σχήμα 20). Το κροτονικό οξύ (5,19 g/L) ξεκίνησε να καταναλώνεται πρώτο, με τη γλυκόζη (4,36 g/L) να καταναλώνεται σταδιακά από την 6<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης και

έπειτα (Σχήμα 21). Το FAN (63,7 mg/L) καταναλώθηκε κατά τις πρώτες 6 ώρες και παρέμεινε σταθερό (14,0 mg/L) μέχρι το τέλος της καλλιέργειας. Η παραγωγή λιπιδίων ανήλθε στα 1,05 g/L αποτελώντας το 20,79% της ξηρής βιομάζας, με απόδοση 0,11 g/g και παραγωγικότητα 0,04 g/(L·h).



Σχήμα 20. Κατανάλωση πηγών άνθρακα (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296



Σχήμα 21. Κατανάλωση 5 g/L κροτονικού οξέος (◆) και 5 g/L γλυκόζης (◇) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296

#### 4.1.5 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις με εμπορικά οργανικά οξέα ως πηγή άνθρακα

Στον Πίνακα 4 απεικονίζεται το προφίλ των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων για τους μικροοργανισμούς που αναπτύχθηκαν σε ασυνεχείς ζυμώσεις με διαφορετικές εμπορικές πηγές άνθρακα. Παρατηρείται ότι το κυρίαρχο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό ( $\Delta^9$ C18:1) του οποίου το ποσοστό κυμάνθηκε μεταξύ 44,63% και 59,63%, ενώ ακολούθησε το παλμιτικό οξύ (C16:0) με εύρος από 17,95% έως 29,03%. Στη συνέχεια ακολούθησε το λινελαϊκό ( $\Delta^{9,12}$ C18:2) και το στεατικό οξύ (C18:0), ενώ τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα εντοπίζονται σε χαμηλότερα ποσοστά.

**Πίνακας 4. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις με εμπορικά οργανικά οξέα ως πηγή άνθρακα**

| Πηγή άνθρακα            | Συγκέντρωση   | Μικροοργανισμός      | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | Άλλα |
|-------------------------|---------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| Οξικό οξύ               | 6 g/L         | <i>C. curvatus</i>   | 26,48 | 0,00  | 4,90  | 50,02 | 11,54 | 7,07 |
|                         |               | <i>L. starkeyi</i>   | 25,89 | 0,29  | 5,39  | 52,88 | 10,43 | 5,12 |
|                         |               | <i>R. toruloides</i> | 25,05 | 0,00  | 4,44  | 54,22 | 14,48 | 1,81 |
|                         | 18 g/L        | <i>C. curvatus</i>   | 19,21 | 0,00  | 6,05  | 59,47 | 12,97 | 2,31 |
|                         |               | <i>L. starkeyi</i>   | 17,95 | 0,00  | 3,99  | 55,20 | 19,98 | 5,89 |
|                         |               | <i>R. toruloides</i> | 18,58 | 0,38  | 6,19  | 59,63 | 8,60  | 6,62 |
| Γαλακτικό οξύ           | 10 g/L        | <i>C. curvatus</i>   | 23,22 | 0,00  | 5,10  | 50,97 | 14,48 | 6,64 |
|                         |               | <i>L. starkeyi</i>   | 21,36 | 12,24 | 2,46  | 44,63 | 17,55 | 1,77 |
|                         | 20 g/L        | <i>C. curvatus</i>   | 27,15 | 0,00  | 5,50  | 52,06 | 12,39 | 2,90 |
|                         |               | <i>L. starkeyi</i>   | 26,26 | 0,00  | 6,47  | 54,60 | 6,60  | 6,07 |
| Ηλεκτρικό οξύ           | 8 g/L         | <i>C. curvatus</i>   | 29,03 | 0,00  | 4,75  | 48,63 | 14,34 | 3,25 |
|                         |               | <i>L. starkeyi</i>   | 24,31 | 0,00  | 4,90  | 48,70 | 18,59 | 3,50 |
|                         | 17 g/L        | <i>C. curvatus</i>   | 24,21 | 0,00  | 2,52  | 55,63 | 14,59 | 3,05 |
|                         |               | <i>L. starkeyi</i>   | 23,77 | 2,50  | 3,25  | 50,96 | 16,83 | 2,70 |
| Κροτονικό οξύ + Γλυκόζη | 5 g/L + 5 g/L | <i>C. curvatus</i>   | 25,12 | 0,22  | 4,65  | 49,74 | 15,76 | 4,51 |
|                         |               | <i>L. starkeyi</i>   | 21,87 | 0,00  | 3,62  | 58,36 | 14,46 | 1,69 |

## 4.2 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση υδρολυμάτων βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών προς παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις

Σε συνέχεια των ασυνεχών ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση εμπορικών οργανικών οξέων για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, τα στελέχη *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να καταναλώνουν υδρολύματα βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών. Η μελέτη επικεντρώθηκε στη χρήση των προϊόντων της αποικοδόμησης των πολυμερών PLA και PHB, όπως και σε μείγμα αυτών, με τα υδρολύματά τους ως τις κύριες πηγές άνθρακα για παραγωγή μικροβιακού λίπους. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες και οι μικροοργανισμοί υποβλήθηκαν σε καλλιέργειες με χαμηλές και υψηλότερες συγκεντρώσεις αντίστοιχα. Ως πηγή αζώτου και σε αυτή την περίπτωση προστέθηκε 1 g/L εκχύλισμα ζύμης και 2 g/L βακτηριολογική πεπτόνη.

Στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν με υδρόλυμα PLA, η μέγιστη παραγωγή λίπους στα στελέχη *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 ανήλθε στα 2,28 g/L και 1,66 g/L αντίστοιχα, με αποδόσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 0,06-0,11 g/g. Ομοίως, με το υδρόλυμα PHB ως πηγή άνθρακα, οι μικροοργανισμοί παρήγαγαν 1,30 g/L και 1,07 g/L μικροβιακού λίπους αντίστοιχα με αποδόσεις μεταξύ 0,09-0,13 g/g. Τα κύτταρα στις εν λόγω ζυμώσεις παρουσίασαν τιμές λιποπεριεκτικότητας μεταξύ 10,89-26,40% w/w, ενώ η παραγωγικότητα δεν παρουσίασε υψηλές τιμές (0,03-0,09 g/(L·h)). Επιπλέον, και τα δύο στελέχη κατανάλωσαν πλήρως το μείγμα υδρολύματος PLA (5 g/L) και υδρολύματος PHB (5 g/L) με παραγόμενα λιπίδια 1,19 g/L και 1,11 g/L αντίστοιχα, με απόδοση 0,10 g/g και από τους δύο μικροοργανισμούς. Τέλος, το υπόστρωμα με 10 g/L υδρόλυμα PLA και 5 g/L υδρόλυμα PHB δεν καταναλώθηκε από τις προς εξέταση ζύμες.

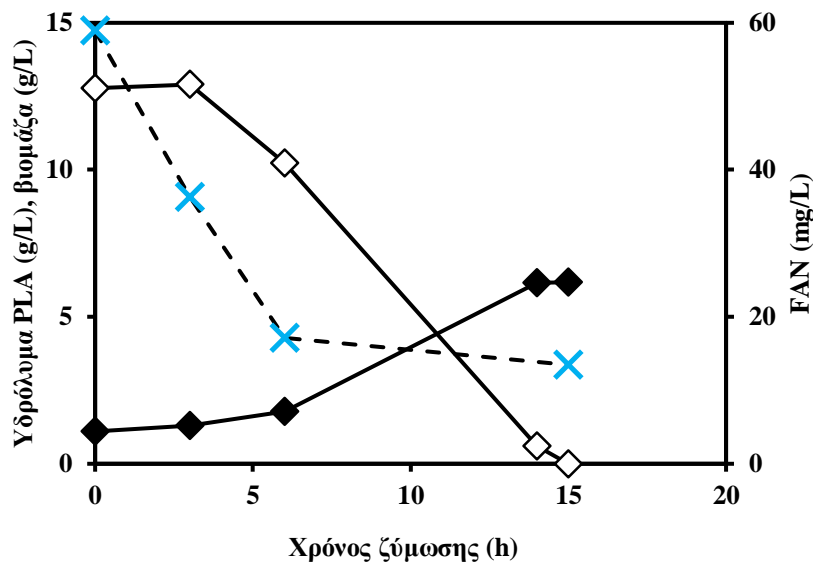
**Πίνακας 5. Συνοπτικά αποτελέσματα της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων από διαφορετικούς μικροοργανισμούς και διαφορετικές πηγές άνθρακα**

| Αρχική πηγή άνθρακα                            | Μικροοργανισμός               | Βιομάζα (g/L) | Λίπος (g/L) | Περιεκτικότητα σε λίπος (%) | Απόδοση (g/g) | Παραγωγικότητα (g/L/h) |
|--|-------------------------------|---------------|-------------|-----------------------------|---------------|------------------------|
| Υδρόλυμα PLA<br>13 g/L                         | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 | 6,18          | 0,89        | 13,91                       | 0,07          | 0,06                   |
|  | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296  | 5,6           | 1,37        | 23,17                       | 0,11          | 0,09                   |
| Υδρόλυμα PLA<br>27 g/L                         | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 | 8,86          | 2,28        | 26,40                       | 0,09          | 0,09                   |
|  | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296  | 8,66          | 1,66        | 19,86                       | 0,06          | 0,06                   |
| Υδρόλυμα PHB<br>5 g/L                          | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 | 4,45          | 0,64        | 14,26                       | 0,13          | 0,04                   |
|  | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296  | 4,15          | 0,44        | 10,89                       | 0,09          | 0,03                   |
| Υδρόλυμα PHB<br>10 g/L                         | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 | 7,48          | 1,30        | 17,51                       | 0,13          | 0,05                   |
|  | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296  | 6,95          | 1,07        | 16,62                       | 0,10          | 0,03                   |
| Υδρόλυμα PLA<br>5 g/L + Υδρόλυμα<br>PHB 5 g/L  | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 | 7,90          | 1,19        | 15,11                       | 0,10          | 0,09                   |
|  | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296  | 6,77          | 1,11        | 16,51                       | 0,10          | 0,05                   |
| Υδρόλυμα PLA<br>10 g/L + Υδρόλυμα<br>PHB 5 g/L | <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 |               |             | Δεν καταναλώθηκε            |               |                        |
|  | <i>L. starkeyi</i> DSM 70296  |               |             | Δεν καταναλώθηκε            |               |                        |



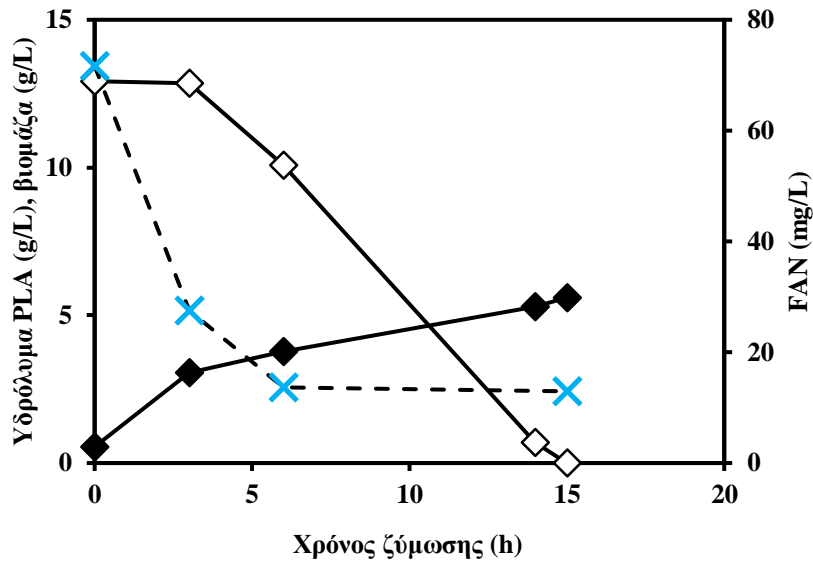
#### 4.2.1 Ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρόλυμα PLA ως πηγή άνθρακα

Κατά την ανάπτυξη του *C. curvatus* ATCC 20509 σε υδρόλυμα PLA (Σχήμα 22), η αρχική συγκέντρωσή του γαλακτικού οξέος ήταν 12,78 g/L και καταναλώθηκε μέσα σε 15 ώρες. Η μεγαλύτερη ποσότητα ελεύθερων αμινομάδων (FAN) καταναλώθηκε στις 6 πρώτες ώρες, με την τιμή τους να παραμένει σταθερή από το σημείο αυτό μέχρι το τέλος της ζύμωσης (13,45 mg/L). Η βιομάζα έφτασε στα 6,18 g/L και το ενδοκυτταρικό λίπος στα 0,89 g/L, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 13,91% λιποπεριεκτικότητα. Η απόδοση παραγωγής ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους έφτασε στα 0,07 g λίπους ανά g καταναλωθέντος οξέος και η παραγωγικότητα στα 0,06 g/(L·h).



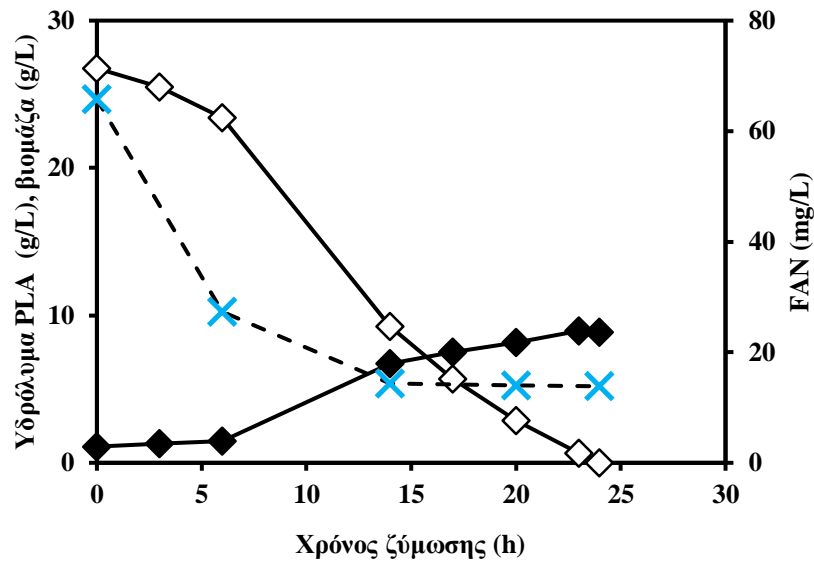
**Σχήμα 22. Κατανάλωση υδρολύματος PLA (◇) αρχικής συγκέντρωσης 13 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. Curvatus* ATCC 20509**

Ομοίως, το στέλεχος της ζύμης *L. starkeyi* DSM 70296 κατανάλωσε ποσότητα γαλακτικού οξέος συγκέντρωσης 12,92 g/L εντός 15 ωρών, με τη βιομάζα να ανέρχεται στα 5,6 g/L και τα λιπίδια στα 1,37 g/L. Το FAN (71,65 mg/L) καταναλώθηκε εντός των 6 πρώτων ωρών, με τελική συγκέντρωση 12,94 mg/L στο μέσο της ζύμωσης. Η λιποπεριεκτικότητα των κυττάρων ήταν 23,17% w/w, η απόδοση λιπιδίων 0,11 g/g και η παραγωγικότητα 0,09 g/(L·h) (Σχήμα 23).



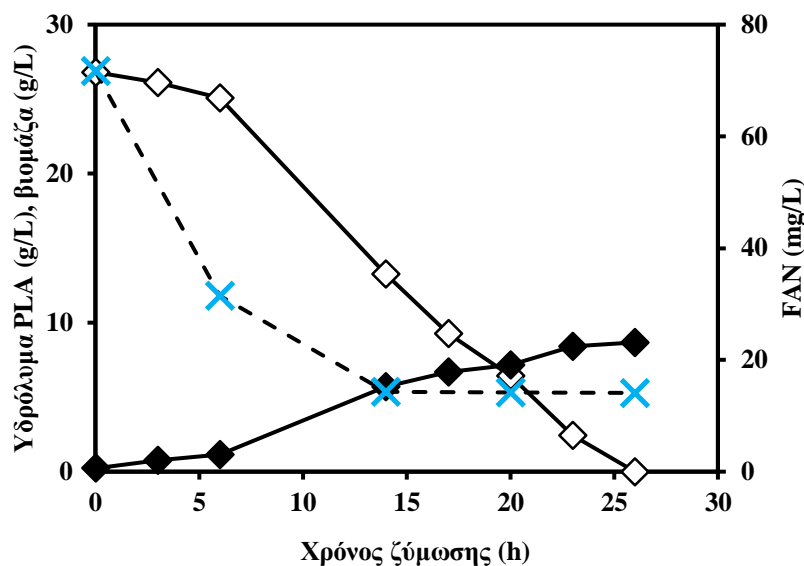
**Σχήμα 23. Κατανάλωση υδρολύματος PLA (◇) αρχικής συγκέντρωσης 13 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296**

Στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 26,76 g/L, ο *C. curvatus* ATCC 20509 κατανάλωσε πλήρως την πηγή άνθρακα σε 24 ώρες (Σχήμα 24). Η βιομάζα ανήλθε στα 8,86 g/L και τα λιπίδια στα 2,28 g/L που αντιστοιχεί σε λιποπεριεκτικότητα της τάξης του 26,40% w/w. Η απόδοση λιπιδίων ήταν 0,09 g/g, η παραγωγικότητα 0,09 g/(L·h) και το FAN (65,78 mg/L) καταναλώθηκε έως τα 13,83 mg/L μέχρι την πλήρη κατανάλωση γαλακτικού οξέος.



**Σχήμα 24. Κατανάλωση υδρολύματος PLA (◇) αρχικής συγκέντρωσης 27 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. Curvatus* ATCC 20509**

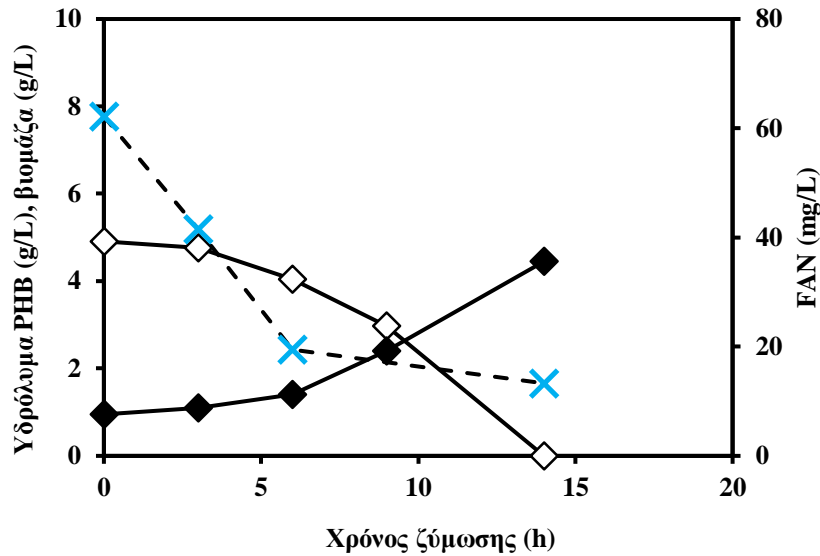
Όσον αφορά τη ζύμωση του *L. starkeyi* DSM 70296 με τη χρήση υδρολύματος PLA ως πηγή άνθρακα (Σχήμα 25), παρουσιάστηκε παρόμοια παραγωγή βιομάζας αλλά μικρότερη παραγωγή μικροβιακού λίπους. Τα λιπίδια προσδιορίστηκαν στα 1,66 g/L σε βιομάζα συγκέντρωσης 8,66 g/L με ενδοκυτταρικό περιεχόμενο 19,86% w/w. Η αρχική συγκέντρωση FAN συγκέντρωσης 71,65 mg/L καταναλώθηκε μέχρι την 14<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης, οπότε και παρέμεινε σταθερή στα 14,22 mg/L. Η απόδοση παραγωγής ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους έφτασε στα 0,06 g λίπους ανά καταναλωθέν γαλακτικό οξύ και η παραγωγικότητα στα 0,06 g/(L·h).



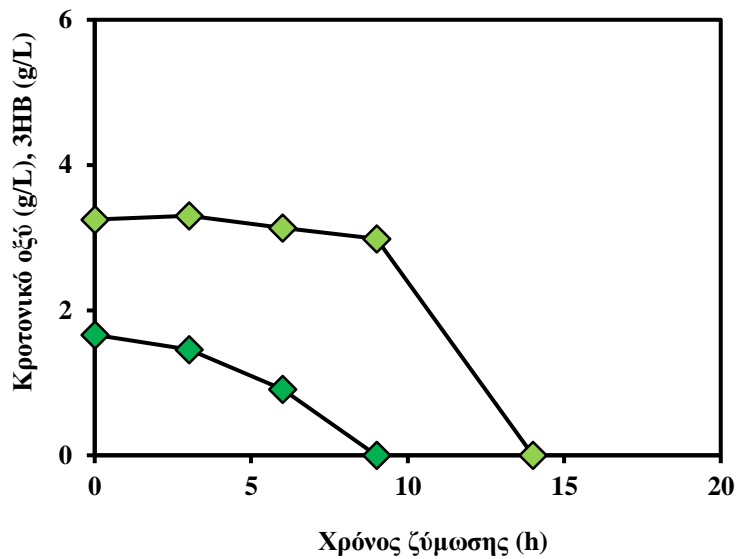
**Σχήμα 25.** Κατανάλωση υδρόλυματος PLA (◇) αρχικής συγκέντρωσης 13 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296

#### 4.2.2 Ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρόλυμα PHB ως πηγή άνθρακα

Ο *C. curvatus* ATCC 20509 αναπτύχθηκε σε ζύμωση με πηγή άνθρακα το υδρόλυμα PHB αρχικής συγκέντρωσης 4,91 g/L, το οποίο αποτελείτο από 1,66 g/L κροτονικό οξύ και 3,25 g/L 3HB (Σχήμα 26). Η καλλιέργεια διήρκησε 14 ώρες και τα δύο μονομερή δεν καταναλώθηκαν παράλληλα, με το κροτονικό οξύ να καταναλώνεται πριν από το 3HB στο μέσο της ζύμωσης (Σχήμα 27). Η παραγωγή βιομάζας ανήλθε στα 4,45 g/L και η παραγωγή μικροβιακού λίπους στα 0,64 g/L. Τα 62,16 mg/L FAN καταναλώθηκαν έως τα 13,28 mg/L στο τέλος της ζύμωσης, η περιεκτικότητα σε λίπος υπολογίστηκε στο 14,25% w/w, η απόδοση της παραγωγής προϊόντος ήταν 0,13 g/g και η παραγωγικότητα 0,04 g/(L·h).



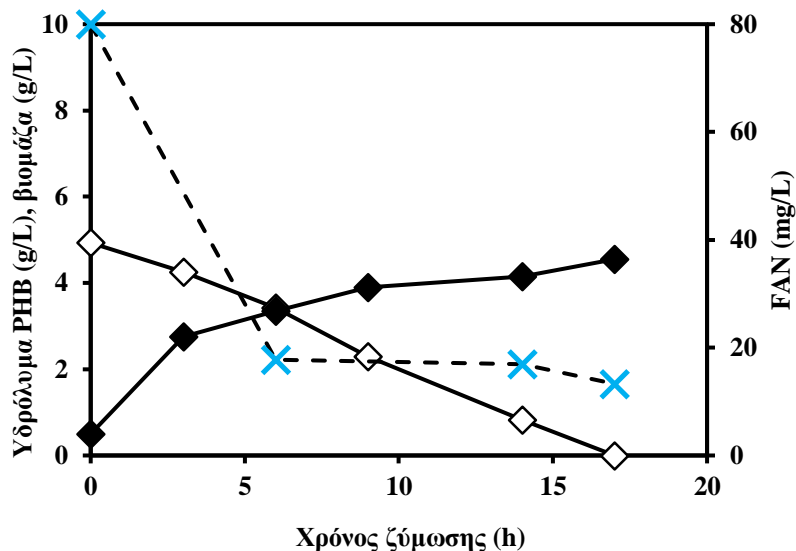
**Σχήμα 26.** Κατανάλωση υδρόλυματος PHB (◇) αρχικής συγκέντρωσης 5 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. Curvatus* ATCC 20509



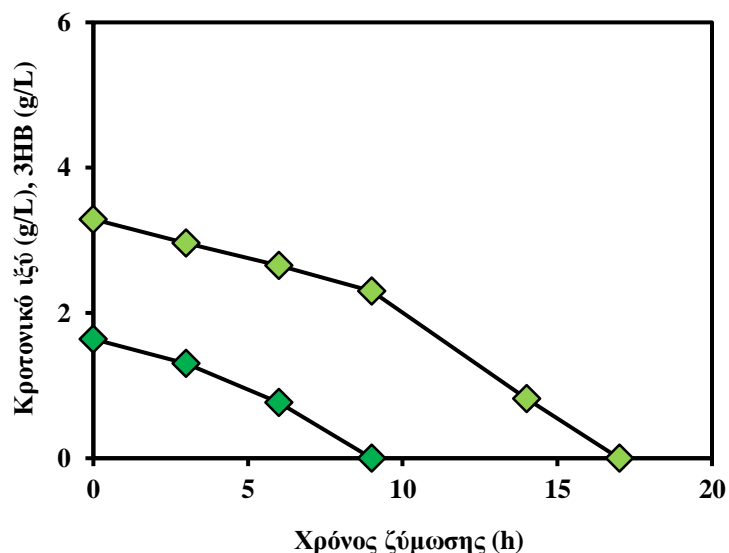
**Σχήμα 27.** Κατανάλωση κροτονικού οξέος (◆) και 3HB (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. Curvatus* ATCC 20509

Αντίστοιχα, ο μικροοργανισμός *L. starkeyi* DSM 70296 κατανάλωσε το εν λόγω υδρόλυμα εντός 17 ωρών παράγοντας 0,44 g/L λιπιδίων σε 4,55 g/L βιομάζας (λιποπεριεκτικότητα 10,90%) (Σχήμα 28). Το FAN (79,95 mg/L) καταναλώθηκε έως τα 13,28 mg/L, η απόδοση παραγωγής μικροβιακού λίπους ήταν 0,09 g/g και η

παραγωγικότητα 0,03 g/(L·h). Τέλος, όσον αφορά την κατανάλωση των επιμέρους μονομερών, ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός πραγματοποίησε παράλληλη κατανάλωσή τους με παρόμοιο ρυθμό μέχρι το τέλος της καλλιέργειας (Σχήμα 29).

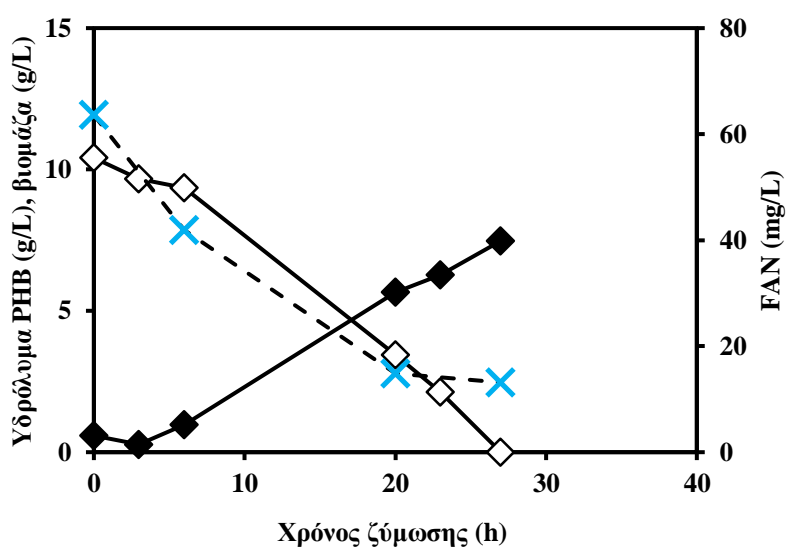


**Σχήμα 28.** Κατανάλωση υδρολύματος PHB (◇) αρχικής συγκέντρωσης 5 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296

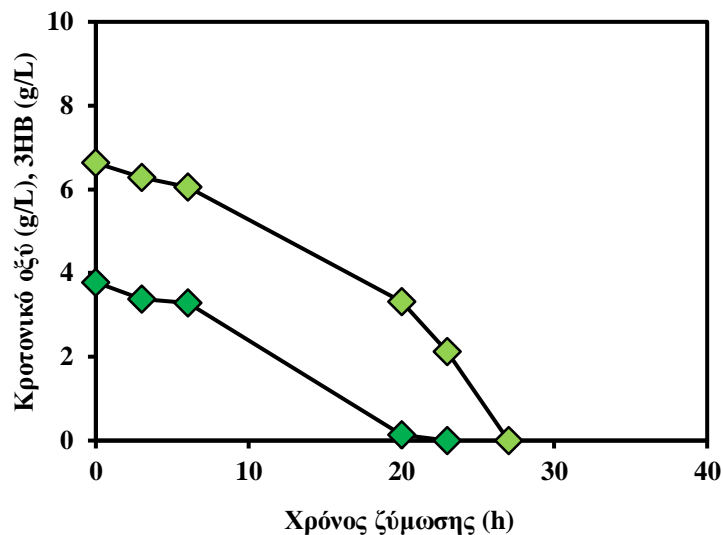


**Σχήμα 29.** Κατανάλωση κροτονικού οξέος (◆) και 3HB (◇) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296

Στο Σχήμα 30 παρουσιάζεται η καλλιέργεια του *C. curvatus* ATCC 20509 σε υδρόλυμα PHB με αρχική συγκέντρωση 10,41 g/L, η κατανάλωσή του οποίου πραγματοποιήθηκε στις 27 ώρες ζύμωσης. Η συγκέντρωση μικροβιακού λίπους έφτασε στα 1,30 g/L σε αντίστοιχη συγκέντρωση 7,46 g/L βιομάζας, που αντιστοιχεί σε 17,51% περιεκτικότητα λίπους. Η συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων καταναλώθηκε εντός 20 ωρών (13,15 mg/L), η απόδοση παραγωγής λιπιδίων έφτασε στα 0,13 g ανά g πηγής άνθρακα και η παραγωγικότητα στα 0,10 g/(L·h). Η κινητική της κατανάλωσης των μονομερών των υδρολυμάτων του PHB αποτυπώνονται στο Σχήμα 31.



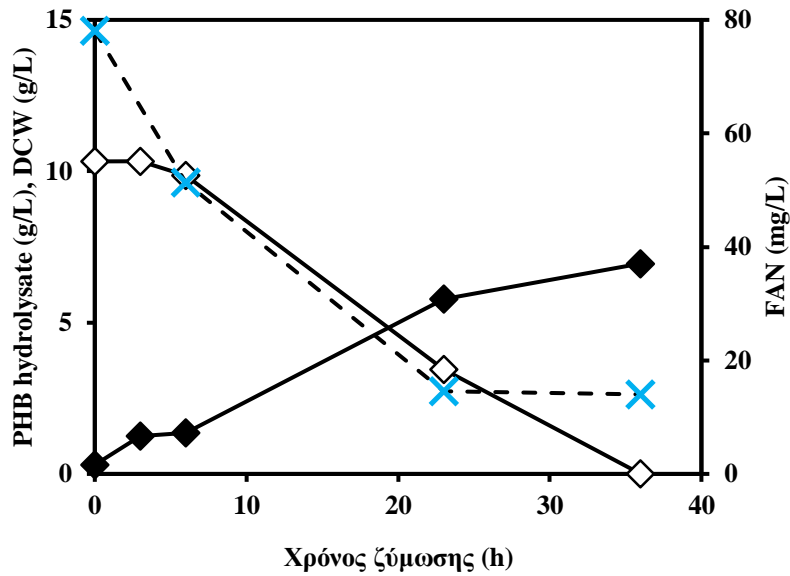
**Σχήμα 30. Κατανάλωση υδρόλυματος PHB (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509**



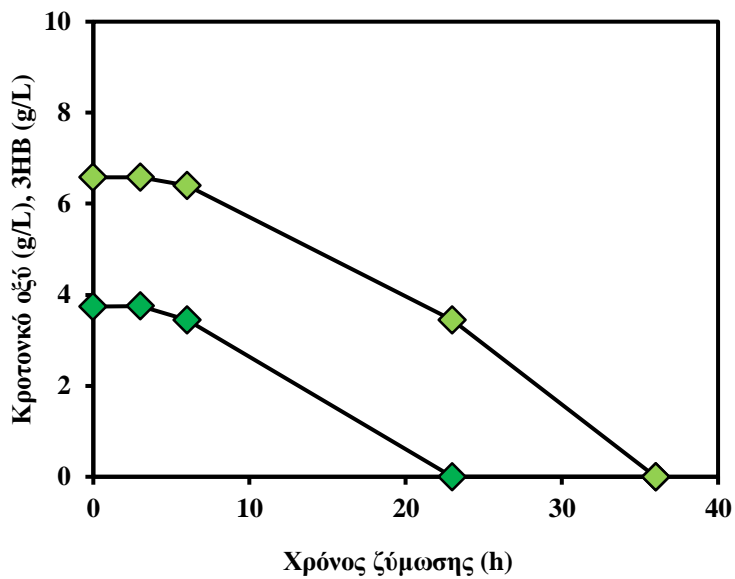
**Σχήμα 31. Κατανάλωση κροτονικού οξέος (◆) και 3HB (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509**

Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 32, το στέλεχος *L. starkeyi* DSM 70296 κατανάλωσε πλήρως τα μονομερή του υδρολύματος του PHB σε 36 ώρες ζύμωσης, με την κινητική τους να αποτυπώνεται στο Σχήμα 33. Η πηγή αζώτου καταναλώθηκε τις πρώτες 23 ώρες, με την συγκέντρωσή της να φτάνει τα 14,01 mg/L. Η συγκέντρωση της βιομάζας ανήλθε στα 6,95 g/L με την περιεκτικότητά της σε λίπος να φτάνει στο 16,62% w/w. Η απόδοση και παραγωγικότητα της ζύμωσης έφτασαν 0,10 g/g και 0,03 g/(L·h) αντίστοιχα.





Σχήμα 32. Κατανάλωση υδρολύματος PHB (◇) αρχικής συγκέντρωσης 10 g/L και FAN (×) και παραγωγή βιομάζας (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296

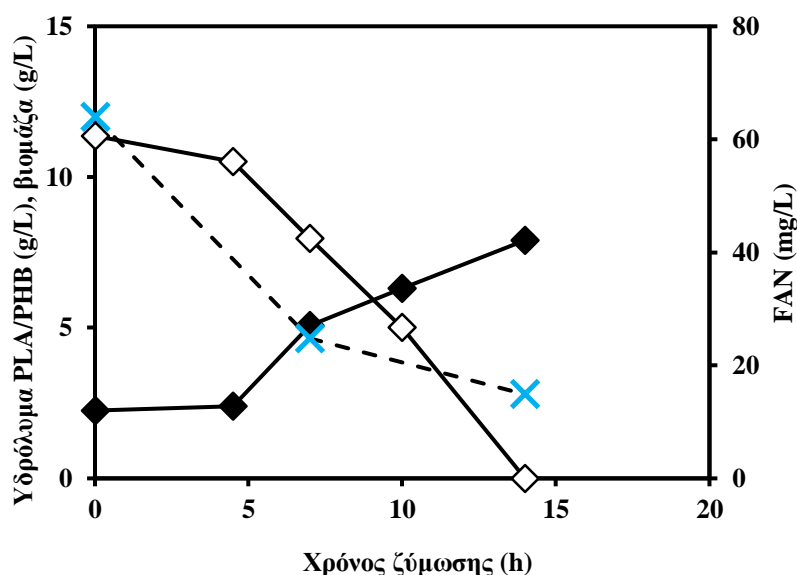


Σχήμα 33. Κατανάλωση κροτονικού οξέος (◆) και 3HB (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296

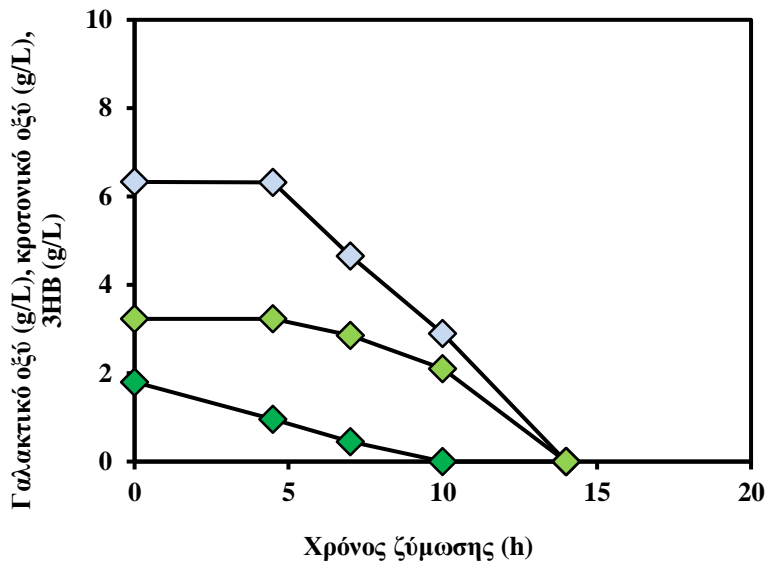
### 4.2.3 Ασυνεχείς ζυμώσεις με μείγμα υδρολυμάτων PLA/PHB ως πηγή άνθρακα

Στο τελευταίο στάδιο της μελέτης που αφορά την αξιοποίηση των βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών σε ασυνεχείς ζυμώσεις, οι μικροοργανισμοί εξετάστηκαν για την ανάπτυξή τους και την παραγωγή μικροβιακού λίπους σε μείγμα μονομερών των PLA/PHB. Συγκεκριμένα, οι πηγές άνθρακα συγκέντρωσης 11,40 g/L αποτελούνταν από 6,40 g/L γαλακτικό οξύ, 1,80 g/L κροτονικό οξύ και 3,15 g/L 3HB.

Στην καλλιέργεια με το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509, τα οργανικά οξέα καταναλώθηκαν εντός 14 ωρών, όπως και το FAN αρχικής συγκέντρωσης 63,95 mg/L που προσδιορίστηκε στα 14,87 mg/L στο τέλος της ζύμωσης (Σχήμα 34). Το μικροβιακό λίπος κατέγραψε συγκέντρωση της τάξης των 1,19 g/L, ποσοστό που αποτελεί το 15,11% της ξηρής βιομάζας. Η απόδοση της παραγωγής λιπιδίων υπολογίστηκε στα 0,10 g/g και η παραγωγικότητα στα 0,09 g/(L·h). Το μονομερές με τη μικρότερη συγκέντρωση (κροτονικό οξύ) άρχισε να καταναλώνεται πρώτα, με τα άλλα δύο να ακολουθούν έπειτα από 4,5 ώρες (Σχήμα 35).

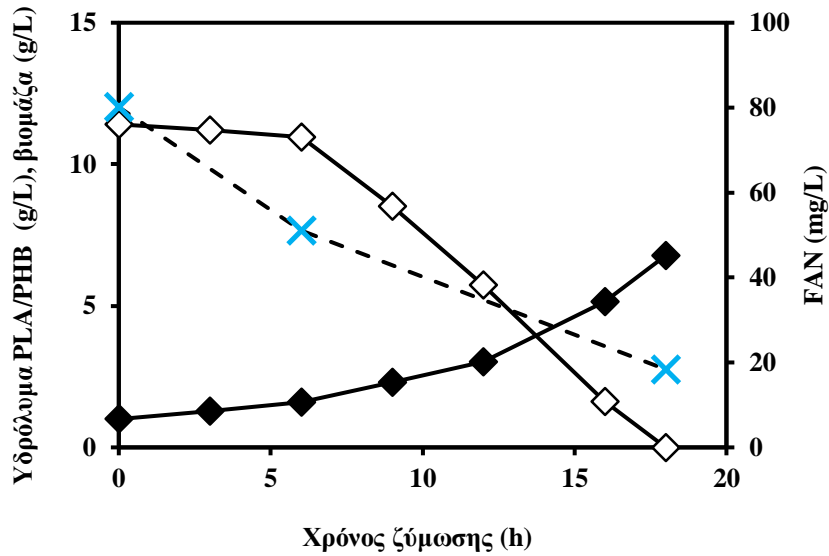


Σχήμα 34. Κατανάλωση μείγματος υδρολυμάτων PLA/PHB ( $\diamond$ ) αρχικής συγκέντρωσης 11 g/L και FAN ( $\times$ ) και παραγωγή βιομάζας ( $\blacklozenge$ ) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509

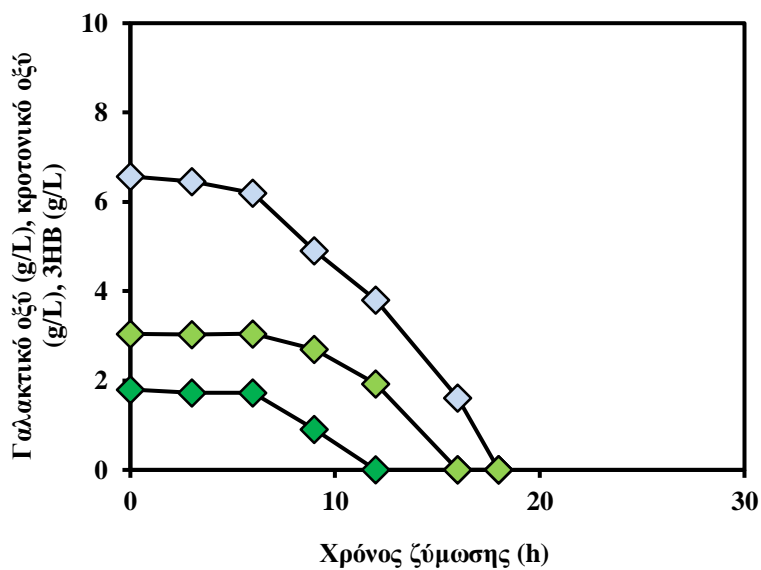


**Σχήμα 35. Κατανάλωση γαλακτικού οξέος (◊), κροτονικού οξέος (◈) και 3HB (◈) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509**

Στο Σχήμα 36 παρουσιάζεται η παραγωγή μικροβιακού λίπους με το στέλεχος *L. starkeyi* DSM 70296. Η ασυνεχής ζύμωση διήρκεσε 18 ώρες και η παραγωγή του λίπους έφτασε στα 1,11 g/L. Η συγκέντρωση της βιομάζας στο τέλος της ζύμωσης έφτασε στα 6,78 g/L με την περιεκτικότητα του λίπους να φτάνει σε ποσοστό ίσο με 16,51% w/w. Η απόδοση της παραγωγής μικροβιακού λίπους έφτασε στο 0,10 g/g και η παραγωγικότητα στο 0,06 g/(L·h). Η κινητική της κατανάλωσης των μονομερών στην εν λόγω ζύμωση παρουσιάζεται στο Σχήμα 37.



Σχήμα 36. Κατανάλωση μείγματος υδρολυμάτων PLA/PHB ( $\diamond$ ) αρχικής συγκέντρωσης 11 g/L και FAN ( $\times$ ) και παραγωγή βιομάζας ( $\blacklozenge$ ) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296



Σχήμα 37. Κατανάλωση γαλακτικού οξέος ( $\lightblue\diamond$ ), κροτονικού οξέος ( $\lightgreen\diamond$ ) και 3HB ( $\blacklozenge$ ) σε ασυνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296

#### 4.2.4 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρολύματα βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών

Το προφίλ των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρολύματα βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών (Πίνακας 6) παρουσίασε ομοιότητες με αυτό των ζυμώσεων με τα εμπορικά οξέα. Συγκεκριμένα, το κυρίαρχο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό ( $^{Δ9}C18:1$ ), το ποσοστό του οποίου κυμάνθηκε μεταξύ 41,28% και 58,18%, ενώ ακολούθησε το παλμιτικό οξύ ( $C16:0$ ) με εύρος από 18,93% έως 29,41%. Στη συνέχεια ακολουθεί το στεατικό ( $C18:0$ ) και το λινελαϊκό οξύ ( $^{Δ9,12}C18:2$ ) σε χαμηλότερα αλλά σημαντικά ποσοστά το καθένα, ενώ τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα ανιχνεύθηκαν σε μη σημαντικές ποσότητες.

**Πίνακας 6. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρολύματα βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών**

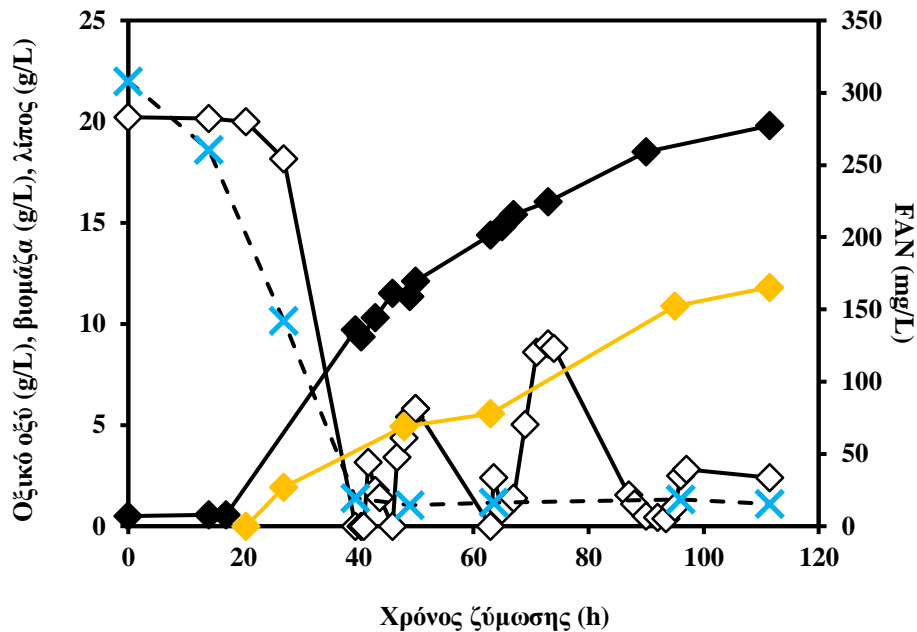
| Πηγή άνθρακα | Συγκέντρωση   | Μικροοργανισμός    | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | Άλλα  |
|--------------|---------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PLA          | 13 g/L        | <i>C. curvatus</i> | 25,30 | 0,78  | 6,82  | 46,33 | 6,94  | 13,83 |
|              |               | <i>L. starkeyi</i> | 29,41 | 0,00  | 2,32  | 57,29 | 7,18  | 3,80  |
|              | 27 g/L        | <i>C. curvatus</i> | 25,55 | 0,00  | 6,40  | 53,71 | 7,43  | 6,91  |
|              |               | <i>L. starkeyi</i> | 25,79 | 0,00  | 2,36  | 58,18 | 10,27 | 3,40  |
| PHB          | 5 g/L         | <i>C. curvatus</i> | 23,45 | 0,00  | 7,01  | 45,30 | 8,45  | 15,79 |
|              |               | <i>L. starkeyi</i> | 22,25 | 0,16  | 6,98  | 41,28 | 6,91  | 22,43 |
|              | 10 g/L        | <i>C. curvatus</i> | 24,54 | 0,00  | 9,53  | 45,69 | 7,23  | 13,01 |
|              |               | <i>L. starkeyi</i> | 20,35 | 0,00  | 4,32  | 49,38 | 22,63 | 3,32  |
| PLA + PHB    | 5 g/L + 5 g/L | <i>C. curvatus</i> | 18,93 | 0,00  | 6,21  | 48,33 | 10,38 | 16,15 |
|              |               | <i>L. starkeyi</i> | 47,87 | 7,24  | 5,46  | 26,92 | 5,31  | 7,22  |

### **4.3 Βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα**

#### **4.3.1 Ημι-συνεχής ζύμωση με οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509**

Σε συνέχεια της μελέτης παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες, το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 υποβλήθηκε σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα Eppendorf BioFlo 120 χωρητικότητας 1 L και ενεργό όγκο 0,7 L. Η αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος που προστέθηκε στο μέσο ήταν 20,22 g/L και η αρχική συγκέντρωση FAN ήταν 308,06 mg/L. Κατά τις 20 πρώτες ώρες της ζύμωσης δεν παρατηρήθηκε κατανάλωση της πηγής άνθρακα ενώ η πηγή αζώτου ξεκίνησε να καταναλώνεται άμεσα μετά τον εμβολιασμό. Στη συνέχεια, με την αύξηση του ρυθμού κατανάλωσης και την μείωση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος διενεργήθηκε τροφοδοσία με αντλία και ο ρυθμός παροχής προσδιορίστηκε σύμφωνα με την αντίστοιχη κατανάλωση της πηγής άνθρακα από τον μικροοργανισμό (Σχήμα 38).

Στις 111,5 ώρες της ημι-συνεχούς ζύμωσης, η συγκέντρωση στις βιομάζας ανήλθε στα 19,8 g/L. Η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων ξεκίνησε παράλληλα με την ανάπτυξη των κυττάρων στις 24 ώρες, με τη μέγιστη παραγωγή λίπους να είναι 11,81 g/L, ποσοστό που αντιστοιχεί σε 59,66% w/w λιποπερικτικότητα. Το FAN καταναλώθηκε εντός 49 ωρών (14,55 mg/L) και παρέμεινε σε αυτή τη συγκέντρωση μέχρι το τέλος. Η μέγιστη απόδοση έφτασε 0,12 g/g και η παραγωγικότητα 0,12 g/(L·h) στις 95 ώρες ζύμωσης.



**Σχήμα 38.** Ημι-συνεχής ζύμωση για παραγωγή βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◇) με οξικό οξύ (◇) ως πηγή άνθρακα με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509

Οι Chi et al. (2011) πραγματοποίησαν ημι-συνεχή ζύμωση με οξικό οξύ σε βιοαντιδραστήρα με τον *C. curvatus* ATCC 20509. Ο αρχικός λόγος C/N ήταν 49 και η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους ανήλθε στα 37 g/L με περιεκτικότητα 53,8% w/w. Στη μελέτη των Christophe et al. (2012) με το στέλεχος *C. curvatus* MUCL 29819 διενεργήθηκε ζύμωση δύο σταδίων. Αρχικά, ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε αρχική συγκέντρωση 15 g/L γλυκόζης και στη συνέχεια η τροφοδοσία έγινε με οξικό οξύ. Η ημι-συνεχής καλλιέργεια έγινε σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες και απέδωσε 6,6 g/L λίπος με περιεκτικότητα εντός των κυττάρων 50,9% w/w, με την απόδοση να είναι 0,15 g λιπιδίων ανά g πηγής άνθρακα. Οι Béliçon et al. (2015) μελέτησαν τη ζύμωση με οξικό οξύ και πραγματοποίησαν βελτιστοποίηση σε παραμέτρους όπως το pH και τον λόγο C/N. Στην καλλιέργεια με αρχικό λόγο C/N=900 προσδιορίστηκε περιεκτικότητα ενδοκυτταρικών λιπιδίων 60% w/w και συγκέντρωση προϊόντος 28,4 g/L, με την απόδοση να ανέρχεται στα 0,18 g/g. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας για τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις του *C. curvatus* σε βιοαντιδραστήρα.

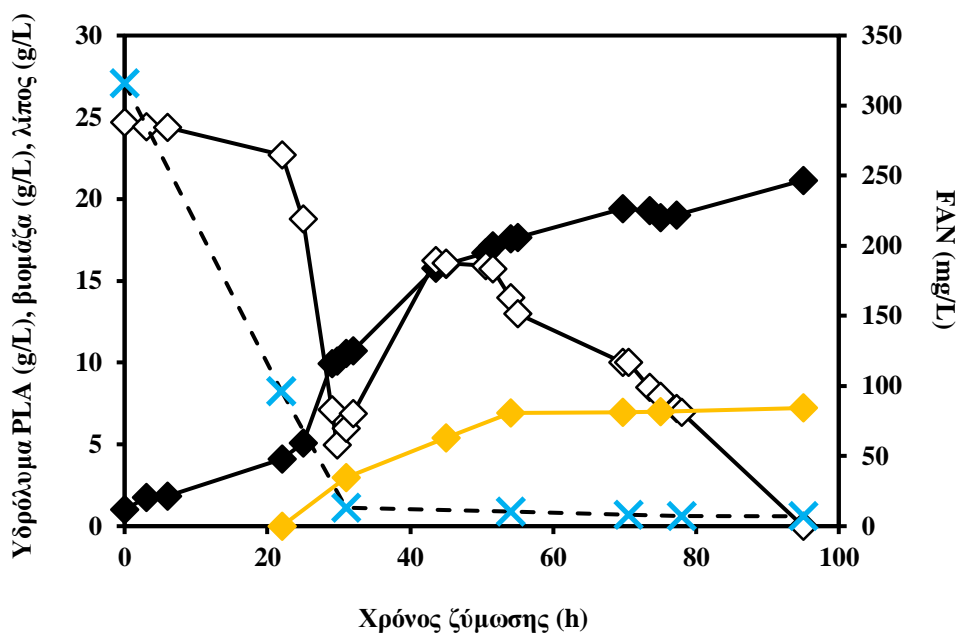
**Πίνακας 7. Βιβλιογραφική ανασκόπηση παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων με οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις**

| Μικροοργανισμός               | Διεργασία ζύμωσης       | Πηγή άνθρακα   | Λίπος (g/L) | Περιεκτικότητα σε λίπος (%) | Αναφορά                  |
|-------------------------------|-------------------------|--|-------------|-----------------------------|--------------------------|
| <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 | Ημι-συνεχής             | Οξικό οξύ  | 37          | 53,8                        | Chi et al. (2011)        |
| <i>C. curvatus</i> MUCL 29819 | Ημι-συνεχής (2 σταδίων) | Γλυκόζη (15 g/L) + οξικό οξύ (5 g/L, συνεχής τροφοδοσία) | 6,9         | 50,9                        | Christophe et al. (2012) |
| <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 | Ημισυνεχείς             | Οξικό οξύ  | 28,4        | 60                          | Béligon et al. (2015)    |

#### **4.3.2 Ημι-συνεχής ζύμωση με υδρόλυμα PLA ως πηγή άνθρακα με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509**

Το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 καλλιεργήθηκε σε ημι-συνεχή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα με υδρόλυμα PLA και σε παρόμοιες συνθήκες με αυτές που προηγήθηκαν με το οξικό οξύ. Η καλλιέργεια διήρκησε 95 ώρες, με την συγκέντρωση πηγής άνθρακα να βρίσκεται αρχικά στα 24,71 g/L. Η συγκέντρωση λίπους ταυτοποιήθηκε στα 7,23 g/L με βιομάζα 21,15 g/L στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN (315,71 mg/L) καταναλώθηκε τις πρώτες 31 ώρες (13,14 mg/L) και παρέμεινε καθ' όλη την υπόλοιπη διάρκεια σε χαμηλά επίπεδα. Η μέγιστη λιποπεριεκτικότητα των κυττάρων παρατηρήθηκε στις 54 ώρες με ποσοστό 39,29% w/w, ενώ κατά τον τερματισμό της καλλιέργειας η συγκεκριμένη τιμή βρέθηκε στα 34,16%. Η απόδοση έφτασε 0,08 g/g και η παραγωγικότητα 0,08 g/(l·h) στις 95 ώρες ζύμωσης. Στο Σχήμα 39 παρουσιάζεται η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια, η παραγωγή προϊόντος και η κατανάλωση των επιμέρους συστατικών.





**Σχήμα 39.** Ημι-συνεχής ζύμωση για παραγωγή βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) με υδρόλυμα PLA (◇) ως πηγή άνθρακα με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509

#### 4.3.3 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις

Το μικροβιακό λίπος που παράχθηκε κατά τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509 υποβλήθηκε σε ανάλυση μέσω αέριας χρωματογραφίας. Η ανάλυση της σύστασης πραγματοποιήθηκε σε δείγματα από διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων (Πίνακας 8).

Κατά την καλλιέργεια με τη χρήση οξικού οξέος ως πηγή άνθρακα αναλύθηκαν δείγματα μικροβιακών λιπιδίων που αντιστοιχούν στις 48, 63, 87, 95 και 111,5 ώρες της ημι-συνεχούς ζύμωσης. Κατά την 48<sup>η</sup> ώρα, το κυρίαρχο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό ( $\Delta^9$ C18:1) με ποσοστό 67,61% επί του συνόλου, ακολουθούμενο από το παλμιτικό (C16:0) με 14,60% και το λινελαϊκό ( $\Delta^{9,12}$ C18:2) με 9,31%. Εν συνεχεία, παρατηρείται μείωση του ποσοστού του  $\Delta^9$ C18:1 και αύξηση του C16:0, με τιμές που διαμορφώνονται στο τέλος της ζύμωσης στα 56,04% και 23,45% αντίστοιχα.

Όσον αφορά τη σύσταση του ελαίου κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με το υδρόλυμα PLA ως πηγή άνθρακα, στην 45η ώρα το λιπαρό οξύ που εντοπίζεται σε

μεγαλύτερο ποσοστό είναι το ελαϊκό ( $\Delta^9$ C18:1) με 58,25% επί του συνόλου, ακολουθούμενο από το παλμιτικό (C16:0) με ποσοστό 25,15% και το λινελαϊκό ( $\Delta^9,12$ C18:2) με 6,95%. Η συγκεκριμένη σύσταση δεν φαίνεται να αλλάζει σημαντικά κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

**Πίνακας 8. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις**

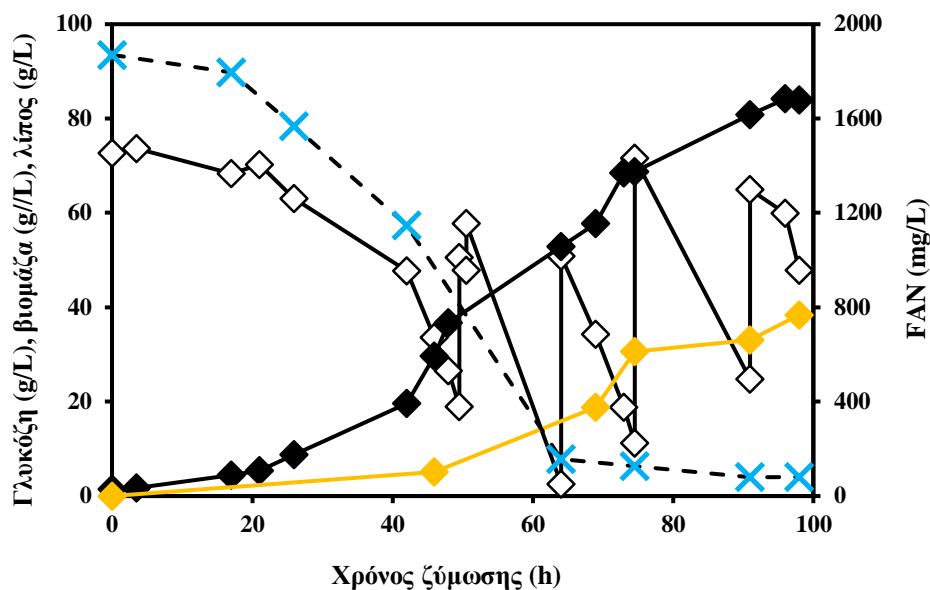
| Πηγή άνθρακα | Χρόνος ζύμωσης (h) | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | Άλλα |
|--------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| Οξικό οξύ    | 48                 | 14,60 | 0,00  | 5,23  | 67,61 | 9,31  | 3,25 |
|              | 63                 | 15,69 | 0,00  | 6,41  | 67,91 | 7,37  | 2,63 |
|              | 87                 | 18,17 | 0,83  | 7,27  | 63,65 | 6,26  | 3,82 |
|              | 95                 | 20,05 | 6,26  | 5,88  | 56,46 | 3,62  | 7,73 |
|              | 111,5              | 23,45 | 2,73  | 6,45  | 56,04 | 5,65  | 5,69 |
| Υδρόλυμα PLA | 45                 | 25,15 | 0,00  | 6,19  | 58,25 | 6,95  | 3,46 |
|              | 54                 | 24,58 | 0,00  | 4,80  | 59,91 | 4,75  | 5,96 |
|              | 69,75              | 24,73 | 0,00  | 5,50  | 59,81 | 5,07  | 4,89 |
|              | 75                 | 24,30 | 0,06  | 5,64  | 59,05 | 4,53  | 6,42 |
|              | 95                 | 23,20 | 0,04  | 6,32  | 59,12 | 7,66  | 9,98 |

## 4.4 Εκχύλιση μικροβιακών λιπιδίων με χρήση πράσινων διαλυτών

Κατά την μελέτη της διαδικασίας της εκχύλισης των μικροβιακών λιπιδίων χρησιμοποιήθηκαν πράσινοι οργανικοί διαλύτες ως αντικαταστάτες των συμβατικών που προέρχονται από ορυκτούς πόρους. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι διαλύτες οξικός αιθυλεστέρας, 1,3-διοξολάνη και d-λεμονένιο οι οποίοι θεωρούνται ανανεώσιμοι, φιλικότεροι προς το περιβάλλον και λιγότερο τοξικοί. Όλα τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με βάση τα αντίστοιχα σε κάθε επέμβαση αποτελέσματα από τη χρήση εξανίου και του διαλύτη folch. Τα ποσοστά ανάκτησης βασίστηκαν στην ποσότητα του ολικού περιεχόμενου λίπους της εξεταζόμενης βιομάζας σύμφωνα με τον προσδιορισμό που πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Soxhlet.

### 4.4.1 Ημι-συνεχής ζύμωση για την παραγωγή μικροβιακής βιομάζας με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509

Για την παραγωγή επαρκούς ποσότητας βιομάζας που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της εκχύλισης του μικροβιακού λίπους πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα με χωρητικότητα 6,7 L (Bioengineering, RALF Advanced) και ενεργό όγκο 3 L. Ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 αναπτύχθηκε υπό αερόβιες συνθήκες και παρήγαγε λίπος με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 72,65 g/L. Η καλλιέργεια διήρκεσε 98 ώρες και η τελική συγκέντρωση της βιομάζας ανήλθε στα 84,15 g/L. Η πηγή αζώτου στην έναρξη της ζύμωσης ήταν σε συγκέντρωση 1869,2 mg/L και καταναλώθηκε σταδιακά με τιμή συγκέντρωσης 78,9 mg/L στο τέλος της καλλιέργειας. Η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού λίπους ανήλθε στα 38,41 g/L με λιποπεριεκτικότητα 46,68% w/w. Η απόδοση παραγωγής λιπιδίων ήταν 0,15 g προϊόντος ανά g καταναλωθείσας γλυκόζης και η παραγωγικότητα 0,39 g/(L·h). Η πορεία της ημι-συνεχούς ζύμωσης αποτυπώνεται στο Σχήμα 40.

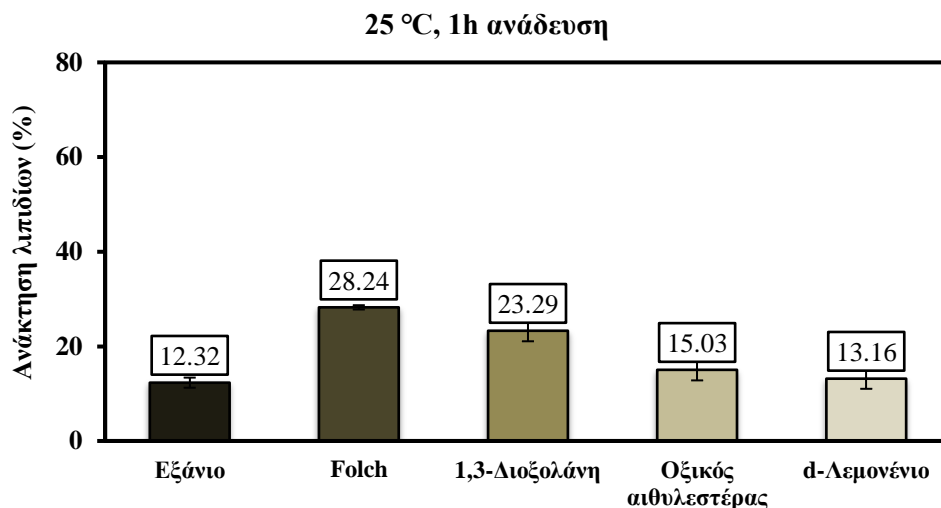


**Σχήμα 40.** Ημι-συνεχής ζύμωση για παραγωγή βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) με γλυκόζη (◇) ως πηγή άνθρακα με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509

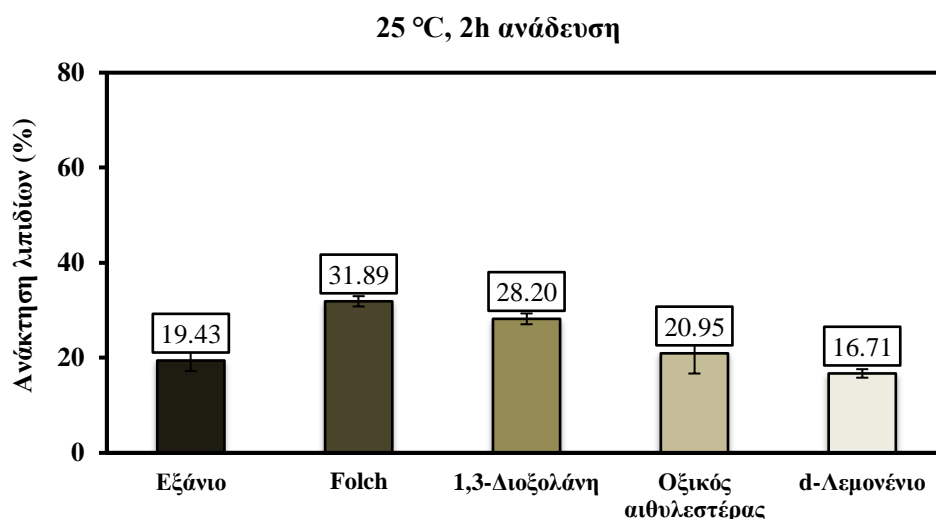
#### 4.4.2 Μελέτη της ανάκτησης μικροβιακών λιπιδίων

Οι επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ικανότητας των υπό μελέτη διαλυτών να εκχυλίζουν τα μικροβιακά λιπίδια, αφορούν την ανάδευση της βιομάζας με τη χρήση των διαλυτών και την θέρμανσή της κατά τη διαδικασία. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν επεμβάσεις με μικρούς χρόνους ανάδευσης και χαμηλές θερμοκρασίες για τον προσδιορισμό του ποσοστού απόδοσης των διαλυτών. Οι διαλύτες με τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

Κατά τη διαδικασία ανάδευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) όλοι οι διαλύτες παρουσίασαν σχετικά χαμηλά ποσοστά ανάκτησης. Με την αύξηση του χρόνου ανάδευσης από 1 ώρα σε 2 ώρες παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού ανάκτησης από όλους τους διαλύτες. Πιο συγκεκριμένα, ο διαλύτης Folch ανέκτησε το 31,89% του ενδοκυτταρικού λίπους, το οποίο ήταν το υψηλότερο μεταξύ των διαλυτών. Η 1,3-διοξολάνη ανέκτησε το 28,2%, ο οξικός αιθυλεστέρας 20,95%, το εξάνιο 19,43% και το d-λεμονένιο 16,71%. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στα Σχήματα 41 και 42.



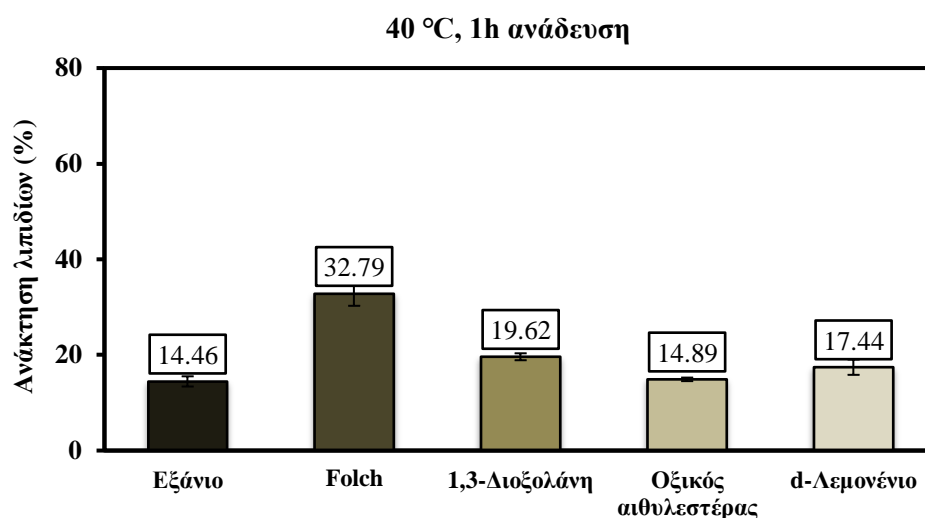
**Σχήμα 41. Ανάκτηση λιπιδίων στους 25°C και ανάδευση για 1 ώρα**



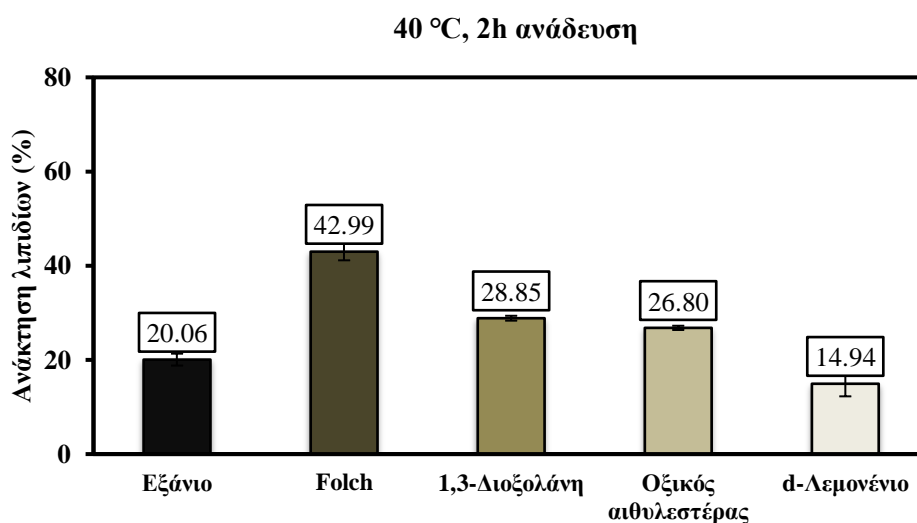
**Σχήμα 42. Ανάκτηση λιπιδίων στους 25°C και ανάδευση για 2 ώρες**

Ομοίως, διενεργήθηκε ανάκτηση με παροχή θέρμανσης και θερμοκρασία 40°C σε μικρά χρονικά διαστήματα (1 και 2 ώρες). Οι περισσότεροι διαλύτες ανέκτησαν μεγαλύτερα ποσοστά λίπους με την αύξηση του χρόνου ανάδευσης στη συγκεκριμένη θερμοκρασία, όπως αποτυπώνεται στα Σχήματα 43 και 44. Εξαίρεση αποτέλεσε το d-λεμονένιο, όπου σε συνδυασμό με τη δυσκολία απομάκρυνσής του λόγω υψηλού σημείου εξάτμισης (175°C) δεν αναλύθηκε περαιτέρω. Ο διαλύτης Folch ανέκτησε το 42,99% των ενδοκυτταρικών λιπιδίων, η 1,3-διοξολάνη 28,85%, ο οξικός αιθυλεστέρας 26,80%, το εξάνιο 20,06% και το d-λεμονένιο 14,94%. Επίσης, ο διαλύτης Folch και ο οξικός αιθυλεστέρας οδήγησαν σε μεγαλύτερο ποσοστό

ανάκτησης με την αύξηση της θερμοκρασίας από 25°C σε 40°C, κάτι που δεν συνέβη με τους υπόλοιπους διαλύτες.



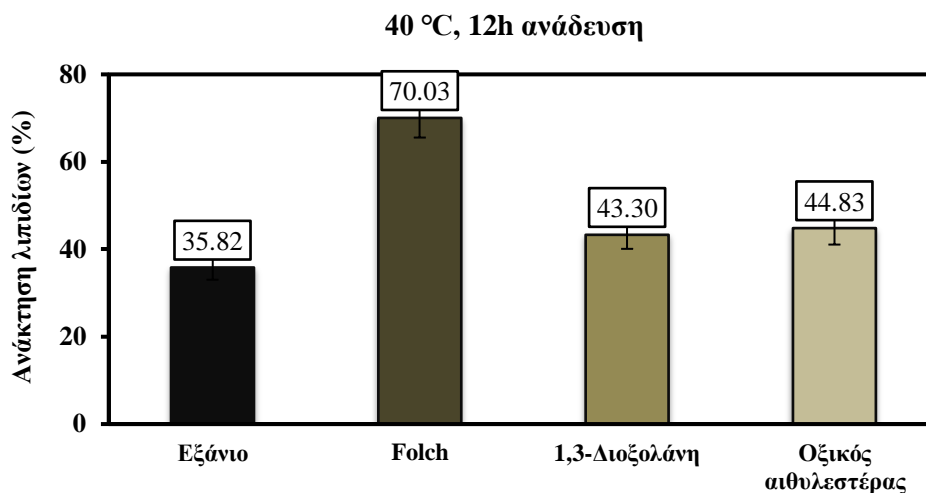
**Σχήμα 43. Ανάκτηση λιπιδίων στους 40°C και ανάδευση για 1 ώρα**



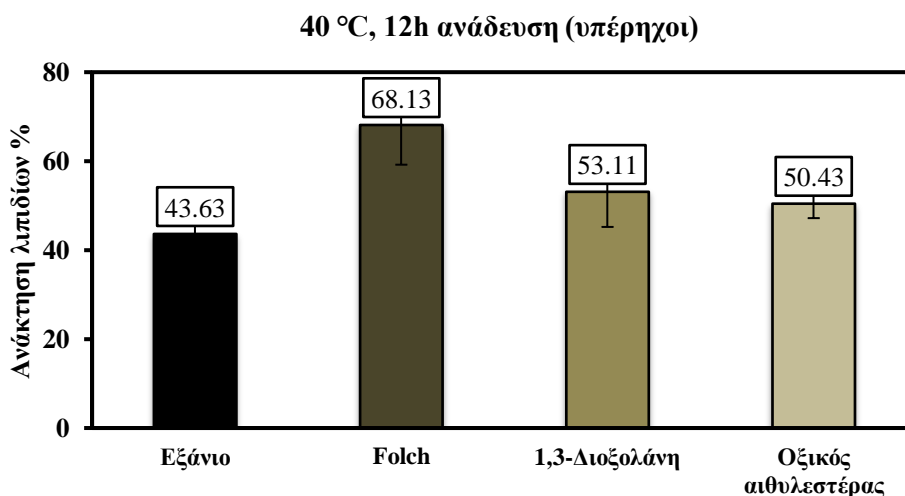
**Σχήμα 44. Ανάκτηση λιπιδίων στους 40°C και ανάδευση για 2 ώρες**

Με την αύξηση της ανάδευσης στις 12 ώρες στους 40°C οι πράσινοι διαλύτες 1,3-διοξολάνη και οξικός αιθυλεστέρας ανέκτησαν 43,30% και 44,83% λιπιδίων αντίστοιχα, τιμές υψηλότερες από αυτές της εκχύλισης με το συμβατικό εξάνιο (35,82%) (Σχήμα 45). Στις ίδιες συνθήκες, πραγματοποιήθηκε διεργασία με χρήση υπερήχων στα κύτταρα για 30 λεπτά πριν την έναρξη της ανάδευσης. Η συγκεκριμένη επέμβαση φάνηκε να έχει σημαντική επίδραση στα ποσοστά ανάκτησης. Κατά τη διεργασία αυτή, η 1,3-διοξολάνη είχε ποσοστό ανάκτησης 53,11% των συνολικών

λιπιδίων, ο οξικός αιθυλεστέρας 50,43% και το εξάνιο 43,63% (Σχήμα 46). Η ανάκτηση με τον διαλύτη Folch ανήλθε στο 70,03%, με τη χρήση υπερήχων να μην φαίνεται να επιδρά σημαντικά.



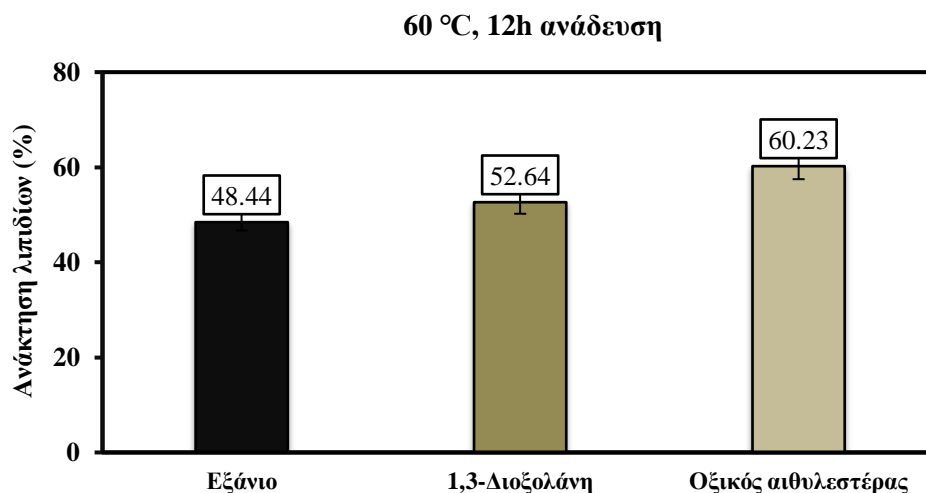
**Σχήμα 45.** Ανάκτηση λιπιδίων στους 40°C και ανάδευση για 12 ώρες



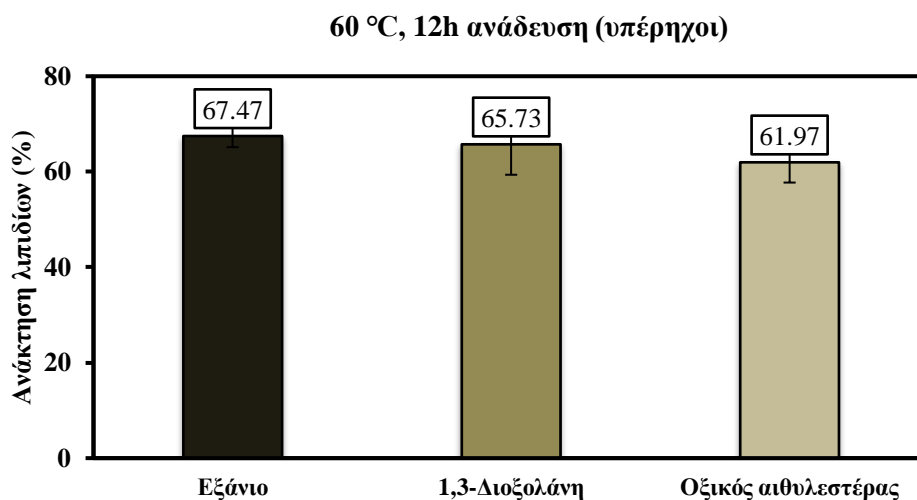
**Σχήμα 46.** Ανάκτηση λιπιδίων με χρήση υπερήχων στους 40°C και ανάδευση για 12 ώρες

Παρόμοια επέμβαση διενεργήθηκε με αύξηση της θερμοκρασίας στους 60°C με και χωρίς τη χρήση υπερήχων, πριν την ανάδευση των κυττάρων με διαλύτη για 12 ώρες. Και σε αυτή την περίπτωση επιτεύχθηκε υψηλότερος διαχωρισμός λιπιδίων σε σχέση με τη διεργασία στους 40°C, με τους πράσινους διαλύτες να ανακτούν μεγαλύτερα ποσοστά από το εξάνιο. Ο οξικός αιθυλεστέρας ανέκτησε το 60,23%, η

1,3-διοξολάνη 52,64% και το εξάνιο παρουσίασε ποσοστό ανάκτησης της τάξης του 48,44% (Σχήμα 47). Η χρήση υπερήχων κατέστησε αποτελεσματικότερη τη συγκεκριμένη διεργασία στις επεμβάσεις με το εξάνιο (67,47%) και την 1,3-διοξολάνη (65,73%), ενώ στην περίπτωση του οξικού αιθυλεστέρα δεν παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση στο ποσοστό του λίπους που εκχυλίστηκε (Σχήμα 48).



**Σχήμα 47. Ανάκτηση λιπιδίων στους 60°C και ανάδευση για 12 ώρες**

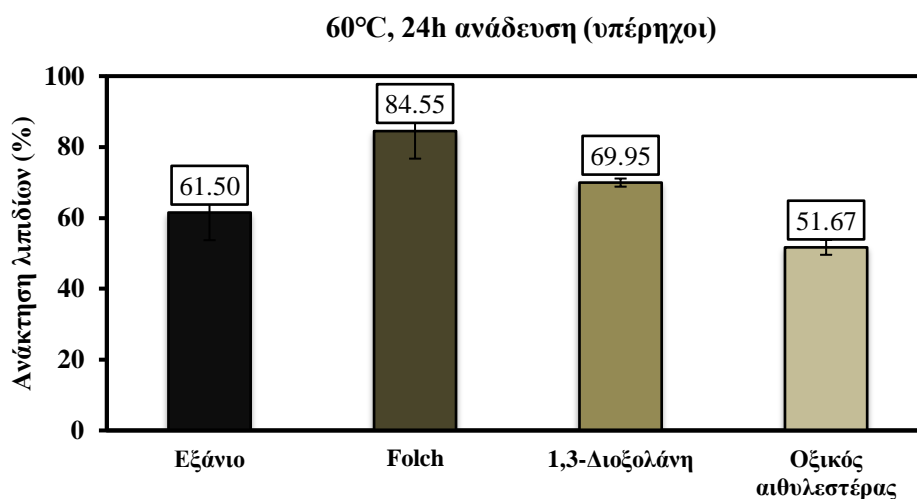


**Σχήμα 48. Ανάκτηση λιπιδίων με χρήση υπερήχων στους 60°C και ανάδευση για 12 ώρες**

Στη συνέχεια, για την επίτευξη υψηλότερης απόδοσης στο διαχωρισμό του λίπους πραγματοποιήθηκαν επεμβάσεις που αφορούν τον χρόνο ως παράμετρο της

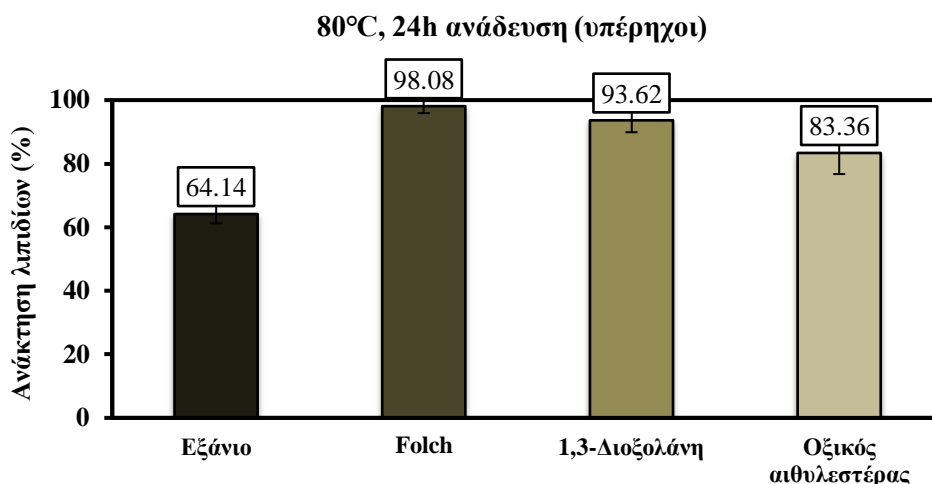


μεθόδου που διενεργήθηκε. Συγκεκριμένα, η χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανάκτησης στους 60°C με ανάδευση για 24 ώρες και με χρήση υπερήχων απέδωσε λιπίδια της τάξης του 69,95% με την 1,3-διοξολάνη, 61,50% με το συμβατικό εξάνιο και 51,67% με τον οξικό αιθυλεστέρα (Σχήμα 49). Η ανάκτηση με τον διαλύτη Folch ανήλθε στο 84,55%, καθιστώντας τον αρκετά αποδοτικό σε υψηλές θερμοκρασίες και σε μεγάλους χρόνους ανάδευσης.



**Σχήμα 49. Ανάκτηση λιπιδίων με χρήση υπερήχων στους 60°C και ανάδευση για 24 ώρες**

Τέλος, η διεργασία στους 80°C για 24 ώρες με χρήση υπερήχων πριν την ανάδευση παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης σε όλους τους διαλύτες. Όσον αφορά τους συμβατικούς διαλύτες, ο διαλύτης Folch σε αυτές τις συνθήκες οδήγησε σε εκχύλιση του 98,08% των περιεχόμενων λιπιδίων και το εξάνιο σε αντίστοιχο ποσοστό της τάξης του 64,14%. Από τους πράσινους διαλύτες, η 1,3-διοξολάνη ανέκτησε το 93,62% και ο οξικός αιθυλεστέρας το 83,36%. Τα αποτελέσματα (Σχήμα 50) καθιστούν τους δύο αυτούς διαλύτες ικανούς να αντικαταστήσουν το πετροχημικής προέλευσης εξάνιο που χρησιμοποιείται εκτενώς στη χημική βιομηχανία στα πλαίσια της ανάγκης εύρεσης ενώσεων που ικανοποιούν τις αρχές της πράσινης χημείας.



**Σχήμα 50. Ανάκτηση λιπιδίων με χρήση υπερήχων στους 80°C και ανάδευση για 24 ώρες**

Στη μελέτη των Breil et al. (2016) πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός λίπους με χρήση πράσινων διαλυτών σε κύτταρα του στελέχους *Yarrowia lipolytica* IFP29. Ο οξικός αιθυλεστέρας μεταξύ άλλων αποδείχθηκε ικανός να αντικαταστήσει τους συμβατικούς διαλύτες τόσο τεχνικά λόγω του χαμηλού σημείου εξάτμισης όσο και οικονομικά, καθώς καταναλώνεται μόλις 5-10% περισσότερη ενέργεια για την απομάκρυνσή του σε σχέση με το εξάνιο. Αντιθέτως, το d-λεμονένιο μεταξύ άλλων δεν κρίθηκε κατάλληλο λόγω της μεγάλης απαιτούμενης ενέργειας για την εξάτμισή του. Οι Imatoukene et al. (2020) μελέτησαν επίσης την εκχύλιση του *Y. lipolytica* έπειτα από ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, με τον οξικό αιθυλεστέρα και το d-λεμονένιο να ανακτούν ποσότητες αντίστοιχες των συμβατικών διαλυτών. Οι Tanzi et al. (2012) και οι Mahmood et al. (2017) χρησιμοποίησαν το d-λεμονένιο και τον οξικό αιθυλεστέρα αντίστοιχα για την εκχύλιση λιπιδίων σε άλγη με τη μέθοδο Soxhlet, με τους προαναφερθέντες διαλύτες να είναι αποτελεσματικότεροι από το εξάνιο. Σε ίδιο τύπο μικροοργανισμών, το d-λεμονένιο δεν αποδείχθηκε αποτελεσματικότερο από διάλυμα χλωροφορμίου/μεθανόλης 1:2 (Tanzi et al., 2013), ενώ ανέκτησε μεγαλύτερο ποσοστό σε διάλυμα διαλύτη/αιθανόλης 1:1 έναντι του εξανίου (Golmakani et al., 2014). Στον Πίνακα 9 παρουσιάζεται βιβλιογραφική ανασκόπηση των υπό μελέτη πράσινων διαλυτών για την εκχύλιση λιπιδίων σε διάφορους ελαιογόνους μικροοργανισμούς.

**Πίνακας 9. Βιβλιογραφική ανασκόπηση χρήσης πράσινων διαλυτών για την εκχύλιση μικροβιακών λιπιδίων**

| Μικροοργανισμός                         | Μέθοδος  | Διαλύτης                           | Ποσοστό ανάκτησης % | Αναφορά                  |
|---|--|------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| <i>Yarrowia lipolytica</i>              | Ανάδευση για 30 min, φυγοκέντριση (500 rpm, 10 min, 25°C) και εξάτμιση | <i>n</i> -εξάνιο                   | 14.03±0.67          | Breil et al. (2016)      |
|   |  | Οξικός αιθυλεστέρας                | 12.63±0.64          |                          |
|   |  | <i>d</i> -λεμονένιο                | 13.67±0.83          |                          |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>              | Bead milling   | Folch                              | 92.9                | Imatoukene et al. (2020) |
|   |  | <i>n</i> -εξάνιο                   | 82.0                |                          |
|   |  | Οξικός αιθυλεστέρας                | 94.9                |                          |
|   | Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης  | <i>d</i> -λεμονένιο                | 79.6                |                          |
|   |  | Folch                              | 99.6                |                          |
|   |  | <i>n</i> -εξάνιο                   | 98.0                |                          |
| <i>Chlorella vulgaris</i>               | Εκχύλιση Soxhlet για 8h  | Οξικός αιθυλεστέρας                | 95.7                | Tanzi et al. (2012)      |
|   |  | <i>d</i> -λεμονένιο                | 94.7                |                          |
|   |  | Bligh & Dyer                       | 3.36±0.02           |                          |
| <i>Chlorella vulgaris</i>               | Εκχύλιση Soxhlet για 8h  | <i>n</i> -εξάνιο                   | 0.88±0.01           | Mahmood et al. (2017)    |
|   |  | Οξικός αιθυλεστέρας                | 22.37               |                          |
|   |  | <i>d</i> -λεμονένιο                | 1.29±0.01           |                          |
| <i>Nannochloropsis sp.</i>              | Διαδικασία Ταυτόχρονης Απόσταξης και Εκχύλισης για 30 min              | <i>n</i> -εξάνιο                   | 16.28               | Tanzi et al. (2013)      |
|   |  | Οξικός αιθυλεστέρας                | 31.62               |                          |
|   |  | Bligh & Dyer                       | 23.78±2.13          |                          |
| <i>Dunaliella salina</i> (υγρή βιομάζα) | Υγρή εκχύλιση υπό πίεση, 180 °C, 20.7 Mpa για 15 min                   | <i>d</i> -λεμονένιο                | 18.73±6.58          | Golmakani et al. (2014)  |
|   |  | Bligh & Dyer                       | 4.03±0.01           |                          |
| <i>Spirulina platensis</i>              | Υγρή εκχύλιση υπό πίεση, 180 °C, 20.7 Mpa για 15 min                   | <i>d</i> -λεμονένιο                | 2.94±0.02           | Golmakani et al. (2014)  |
|   |  | <i>n</i> -εξάνιο:αιθανόλη (1:1)    | 13.2±0.9            |                          |
|   |  | <i>d</i> -λεμονένιο:αιθανόλη (1:1) | 14.4±1.0            |                          |

### 4.3.3 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων κατά την εκχύλισή τους με πράσινους διαλύτες

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται το προφίλ των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων που εκχυλίστηκαν τόσο με συμβατικούς όσο και με πράσινους διαλύτες. Τα λιπαρά οξέα που αποτυπώνονται στα αποτελέσματα είναι τα παλμιτικό (C16:0), στεαρικό (C18:0) και ελαϊκό οξύ ( $\Delta^9$ C18:1) καθώς αποτελούν τα κυρίαρχα λιπαρά που απαντώνται στο μικροβιακό λίπος, όπως και τα παλμιτελαϊκό ( $\Delta^9$ C16:1) και λινελαϊκό οξύ ( $\Delta^{9,12}$ C18:2) που βρίσκονται σε μικρότερα ποσοστά. Μεταξύ των διαλυτών δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη σύσταση των εκχυλίσμων λιπιδίων, αποτέλεσμα που συμφωνεί με την μελέτη των Breil et al. (2016) και Imatoukene et al. (2020). Κατά την εκχύλιση σε μικρούς χρόνους ανάδευσης και χαμηλής θερμοκρασίας, το ποσοστό παλμιτικού οξέος μεταξύ των χρησιμοποιούμενων διαλυτών κυμάνθηκε μεταξύ 25,22% και 26,26%, το ποσοστό του στεαρικού οξέος μεταξύ 16,04% και 16,65%, ενώ αυτό του ελαϊκού οξέος μεταξύ 52,62 και 55,21%. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα ακολούθησαν σε χαμηλά αθροιστικά ποσοστά (<5%). Συμπερασματικά, το προφίλ των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων κατά τη διεργασία ανάκτησης δεν προμηνύει σημαντική συσχέτιση με τον διαλύτη εκχύλισης.

**Πίνακας 10. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων των μικροβιακών λιπιδίων με διαφορετικούς διαλύτες και σε διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης**

| Διαλύτης            | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | Άλλα |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| Εξάνιο              | 25,22 | 0,15  | 16,65 | 55,21 | 0,57  | 2,20 |
| Folch               | 25,25 | 0,30  | 16,24 | 54,22 | 0,58  | 3,42 |
| 1,3-διοξολάνη       | 26,26 | 0,09  | 16,04 | 52,61 | 0,37  | 4,63 |
| Οξικός αιθυλεστέρας | 25,66 | 0,56  | 16,44 | 54,78 | 0,54  | 2,01 |

## 5. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκαν το οξικό οξύ και υδρολύματα βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και μελετήθηκε η χρήση πράσινων οργανικών διαλυτών κατά τη διαδικασία ανάκτησής τους.

Αρχικά, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509, *L. starkeyi* DSM 70296 και *R. toruloides* NRRL Y-27012 υποβλήθηκαν σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα διάφορα εμπορικά οξέα (οξικό, γαλακτικό, ηλεκτρικό, κροτονικό) ορισμένα από τα οποία αποτελούν μονομερή βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών. Οι δύο πρώτοι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε παρόμοιες καλλιέργειες με μονομερή υδρολύματα πλαστικών όπως το πολύ-γαλακτικό οξύ (PLA) και το πολύ-3-υδροξύ-βουτυρικό (PHB). Επιπλέον, το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 αναπτύχθηκε σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα με τα παραπάνω υδρολύματα να αποτελούν την κύρια πηγή άνθρακα. Τέλος, οι πράσινοι διαλύτες οξικός αιθυλεστέρας, 1,3-διοξολάνη και d-λεμονένιο εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να ανακτούν τα μικροβιακά λιπίδια με σκοπό την αντικατάσταση των ευρέως χρησιμοποιούμενων συμβατικών διαλυτών.

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα, τα σημαντικότερα συμπεράσματα που εξήχθηκαν είναι τα εξής:

- Οι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 αναπτύχθηκαν σε όλα τα προς μελέτη εμπορικά οξέα, ενώ το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-27012 αναπτύχθηκε μόνο σε υπόστρωμα με βάση το οξικό οξύ.
- Στις ασυνεχείς ζυμώσεις με οξικό οξύ και αρχική συγκέντρωση 18 g/L, οι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509, *L. starkeyi* DSM 70296 και *R. toruloides* NRRL Y-27012 απέδωσαν 7,43 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 52,60% w/w, 6,89 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 46,80% w/w και 6,83 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 36,00% w/w αντίστοιχα.

- Στις ασυνεχείς ζυμώσεις με γαλακτικό οξύ και αρχική συγκέντρωση 20 g/L, οι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 απέδωσαν 7,20 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 48,46% w/w και 7,83 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 42,32% w/w αντίστοιχα.
- Στις ασυνεχείς ζυμώσεις με ηλεκτρικό οξύ και αρχική συγκέντρωση 17 g/L, οι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 απέδωσαν 7,90 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 39,29% w/w και 7,85 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 36,68% w/w αντίστοιχα, παρότι δεν κατανάλωσαν πλήρως την πηγή άνθρακα του υποστρώματος.
- Στις ασυνεχείς ζυμώσεις με κροτονικό οξύ και γλυκόζη με αρχική συγκέντρωση 5 g/L έκαστος, οι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 απέδωσαν 4,54 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 14,52% w/w και 5,05 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 20,79% w/w αντίστοιχα, ενώ δεν αναπτύχθηκαν σε αντίστοιχες καλλιέργειες με υψηλότερες συγκεντρώσεις.
- Στις ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρόλυμα PLA και αρχική συγκέντρωση 27 g/L, οι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 απέδωσαν 8,86 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 26,40% w/w και 8,66 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 19,86% w/w αντίστοιχα.
- Στις ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρόλυμα PHB και αρχική συγκέντρωση 10 g/L, οι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 απέδωσαν 7,48 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 17,51% w/w και 6,95 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 16,62% w/w αντίστοιχα.
- Στις ασυνεχείς ζυμώσεις με μείγμα υδρολύματος PLA και PHB και αρχική συγκέντρωση 5 g/L έκαστος, οι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 απέδωσαν 7,90 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 15,11% w/w και 6,77 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 16,51% w/w αντίστοιχα, ενώ δεν

αναπτύχθηκαν σε αντίστοιχες καλλιέργειες με υψηλότερες συγκεντρώσεις.

- Στις ημι-συνεχείς ζυμώσεις με οξικό οξύ και υδρόλυμα PLA, ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 απέδωσε 19,8 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 59,66 % w/w και 21,15 g/L ξηρής βιομάζας με λιποπεριεκτικότητα 34,14 % w/w αντίστοιχα.
- Τα ποσοστά ανάκτησης των μικροβιακών λιπιδίων κατά την εκχύλισή τους αυξήθηκαν με την αντίστοιχη αύξηση της θερμοκρασίας και του χρόνου της διεργασίας, όπως και με τη χρήση υπερήχων σε όλους τους χρησιμοποιούμενους διαλύτες.
- Η διεργασία στους 80°C για 24 ώρες με χρήση υπερήχων πριν την ανάδευση παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης, με τον διαλύτη Folch να ανακτά το 98,08% των περιεχόμενων λιπιδίων, την 1,3-διοξολάνη 93,62%, τον οξικό αιθυλεστέρα 83,36% και το εξάνιο ποσοστό της τάξης του 64,14%.

Συμπερασματικά, τα στελέχη *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 αποδείχθηκαν ικανά να αφομοιώσουν τα υπό μελέτη οργανικά οξέα και να συσσωρεύσουν μικροβιακά λιπίδια. Επιπλέον, οι πράσινοι διαλύτες που εξετάστηκαν παρουσίασαν υψηλά ποσοστά ανάκτησης καθιστώντας τους ικανούς να αντικαταστήσουν τους ευρέως χρησιμοποιούμενους συμβατικούς διαλύτες πετροχημικής προέλευσης. Παρόλα αυτά, κρίνεται απαραίτητη η βελτιστοποίηση της διεργασίας της ζύμωσης τόσο σε επίπεδο θρεπτικών μέσων που θα επιτρέπουν την περαιτέρω παραγωγή λίπους, όσο και σε παραμέτρους που αφορούν την οικονομική βιωσιμότητα της εν λόγω διεργασίας. Τέλος, η ανάπτυξη μιας ολοκληρωμένης βιοτεχνολογικής διεργασίας που θα αξιοποιεί βιομηχανικά απόβλητα και βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη λύση που θα ικανοποιεί τους στόχους της κυκλικής οικονομίας.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal, S. (2020). Biodegradable polymers: Present opportunities and challenges in providing a microplastic-free environment. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 221(6), 2000017.
- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(4), 1219-1227.
- Al Rowaihi, I. S., Kick, B., Grötzinger, S. W., Burger, C. & Karan, R., Weuster-Botz, D., Arold, S. T. (2018). A two-stage biological gas to liquid transfer process to convert carbon dioxide into bioplastic. *Bioresource Technology Reports*, 1, 61-68.
- Anastas, P. T., & Kirchhoff, M. M. (2002). Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Accounts of chemical research*, 35(9), 686-694.
- Araujo, G. S., Matos, L. J., Fernandes, J. O., Cartaxo, S. J., Gonçalves, L. R., Fernandes, F. A., & Farias, W. R. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 95-98.
- Bafana, R., Pandey, R. A., (2018). New approaches for itaconic acid production: bottlenecks and possible remedies. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38 (1), 68–82.
- Balasubramanian, R. K., Doan, T. T. Y., & Obbard, J. P. (2013). Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 215, 929-936.
- Beckman, M. (2006) Cell biology. Great balls of fat. *Science* 311 (5765), 1232–1234.
- Beligon, V., Poughon, L., Christophe, G., Lebert, A., Larroche, C., & Fontanille, P. (2015). Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetate. *Bioresour. Technol.* 192, 582–591.
- Beopoulos, A., Nicaud, J. M., & Gaillardin, C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(4), 1193-1206.



- Bettencourt, S., Miranda, C., Pozdniakova, T. A., Sampaio, P., Franco-Duarte, R. & Pais, C. (2020). Single cell oil production by oleaginous yeasts grown in synthetic and waste-derived volatile fatty acids. *Microorganisms*, 8(11), 1809.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Bonturi, N., Matsakas, L., Nilsson, R., Christakopoulos, P., Miranda, E. A., Berglund, K. A., & Rova, U. (2015). Single cell oil producing yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium toruloides*: selection of extraction strategies and biodiesel property prediction. *Energies*, 8(6), 5040-5052.
- Borjian, F., Han, J., Hou, J., Xiang, H. & Berg, I.A. (2016). The methylaspartate cycle in haloarchaea and its possible role in carbon metabolism. *ISME J.* 10 (3), 546–557.
- Breil, C., Meullemiestre, A., Vian, M., & Chemat, F. (2016). Bio-based solvents for green extraction of lipids from oleaginous yeast biomass for sustainable aviation biofuel. *Molecules*, 21(2), 196.
- Briassoulis, D., & Dejean, C. (2010). Critical review of norms and standards for biodegradable agricultural plastics part I. Biodegradation in soil. *Journal of Polymers and the Environment*, 18, 384-400.
- Brown, D. A. (2001) Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol* 11, 446–449.
- Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., Kawarska, A., Stasiak-Róžańska, L., Gientka, I., & Majewska, E. (2014). Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for  $\beta$ -glucan isolation. *Molecules*, 19(12), 20941-20961.
- Capello, C., Fischer, U., & Hungerbühler, K. (2007). What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9(9), 927-934.
- Caporusso, A., Capece, A., & De Bari, I. (2021). Oleaginous yeasts as cell factories for the sustainable production of microbial lipids by the valorization of agri-food wastes. *Fermentation*, 7(2), 50.

- Cescut, J., Severac, E., Molina-Jouve, C., & Uribelarrea, J. L. (2011). Optimizing pressurized liquid extraction of microbial lipids using the response surface method. *Journal of Chromatography A*, 1218(3), 373-379.
- Chemat, S., Tomao, V., & Chemat, F. (2012). Limonene as green solvent for extraction of natural products. In *Green Solvents I* (pp. 175-186). Springer, Dordrecht.
- Cheng, K. K., Zhao, X. B., Zeng, J., Zhang, J. A. (2012). Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels Bioprod. Bioref* 6 (3), 302–318.
- Chen, J., Li, W., Zhang, Z. Z., Tan, T. W., & Li, Z. J. (2018). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of polyhydroxyalkanoates using acetate as a main carbon source. *Microbial cell factories*, 17(1), 1-12.
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* 51, 1412–1421.
- Christodoulou, X. & Velasquez-Orta, S. B. (2016). Microbial electrosynthesis and anaerobic fermentation: an economic evaluation for acetic acid production from CO<sub>2</sub> and CO. *Environmental Science & Technology*, 50(20), 11234-11242.
- Christophe, G., Deo, J. L., Kumar, V., Nouaille, R., Fontanille, P., & Larroche, C. (2012). Production of oils from acetic acid by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167, 1270-1279.
- D'Silva, T. C., Isha, A., Chandra, R., Vijay, V. K., Subbarao, P. M. V., Kumar, R., & Kovács, K. L. (2021). Enhancing methane production in anaerobic digestion through hydrogen assisted pathways—A state-of-the-art review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 151, 111536.
- Dahmen, N., Lewandowski, I., Zibek, S. & Weidtmann, A. (2019). Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives. *Gcb Bioenergy*, 11(1), 107-117.
- Dalmas Neto, C. J., Sydney, E. B., Candeo, E. S., de Souza, E. B. S., Camargo, D., Sydney, A. C. N., ... & Soccol, C. R. (2020). New method for the extraction of single-cell oils from wet oleaginous microbial biomass: efficiency, oil characterisation and energy assessment. *Waste and biomass valorization*, 11(7), 3443-3452.

- Davies, R. J., & Holdsworth, J. E. (1992). Synthesis of lipids in yeasts: biochemistry, physiology and production. *Adv. Appl. Lipid Res*, 1(11).
- De Castro, M. L., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography A*, 1217(16), 2383-2389.
- De Jong, E. & Jungmeier, G. (2015). Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries. In: *Industrial biorefineries & white biotechnology* (pp. 3-33). Elsevier.
- Desa, U. N. (2016). Transforming our world: The 2030 agenda for sustainable development.
- Dittrich, C. R., Vadali, R. V., Bennett, G. N. & San, K. Y. (2005). Redistribution of metabolic fluxes in the central aerobic metabolic pathway of *E. coli* mutant strains with deletion of the *ackA-pta* and *poxB* pathways for the synthesis of isoamyl acetate. *Biotechnol. Prog.* 21 (2), 627–631.
- Dolan, S.K. & Welch, M., 2018. The glyoxylate shunt, 60 years on. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 309–330.
- Dong, T., Knoshaug, E. P., Pienkos, P. T., & Laurens, L. M. (2016). Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: a critical review. *Applied Energy*, 177, 879-895.
- Edwards, J. S., Ibarra, R. U., & Palsson, B. O. (2001). In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nature biotechnology*, 19(2), 125-130.
- European Bioplastics (2011) Fact sheet. European Bioplastics. Available at: [http://en.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2011/04/fs/Bioplastics\\_eng.pdf](http://en.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2011/04/fs/Bioplastics_eng.pdf) (accessed 28 August 2015).
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.
- Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R., & Larroche, C. (2012). Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 114, 443–449.
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y. (2008) Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol* 130, 263–279.

- Gahleitner, M. & Paulik, C. (2014). Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. *Polypropylene*". Mar, 26.
- Garcia-Gonzalez, L., & De Wever, H. (2018). Acetic acid as an indirect sink of CO<sub>2</sub> for the synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA): comparison with PHA production processes directly using CO<sub>2</sub> as feedstock. *Applied Sciences*, 8(9), 1416.
- Garvie, E. I. (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiological reviews*, 44(1), 106-139.
- Geciova, J., Bury, D., & Jelen, P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. *International Dairy Journal*, 12(6), 541-553.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances*, 3(7), e1700782.
- Golmakani, M. T., Mendiola, J. A., Rezaei, K., & Ibáñez, E. (2014). Pressurized limonene as an alternative bio-solvent for the extraction of lipids from marine microorganisms. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 1-7.
- Gong, Z., Shen, H., Zhou, W., Wang, Y., Yang, X., & Zhao, Z. K. (2015). Efficient conversion of acetate into lipids by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnology for biofuels*, 8, 1-9.
- Gong, G., Wu, B., Liu, L., Li, J., Zhu, Q., He, M., & Hu, G. (2022). Metabolic engineering using acetate as a promising building block for the production of bio-based chemicals. *Engineering Microbiology*, 100036.
- Gildemyn, S., Verbeeck, K., Slabbinck, R., Andersen, S. J., PrévotEAU, A. & Rabaey, K. (2015). Integrated production, extraction, and concentration of acetic acid from CO<sub>2</sub> through microbial electrosynthesis. *Environmental Science & Technology Letters*, 2(11), 325-328.
- Gui, M. M., Lee, K. T., & Bhatia, S. (2008). Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy*, 33(11), 1646-1653.

- Gür, T. M. (2022). Carbon dioxide emissions, capture, storage and utilization: Review of materials, processes and technologies. *Progress in Energy and Combustion Science*, 89, 100965.
- Halim, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology advances*, 30(3), 709-732.
- Hu, P., Chakraborty, S., Kumar, A., Woolston, B., Liu, H., Emerson, D. & Stephanopoulos, G. (2016). Integrated bioprocess for conversion of gaseous substrates to liquids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(14), 3773-3778.
- Hua, Q., Joyce, A. R., Palsson, B. Ø., & Fong, S. S. (2007). Metabolic characterization of *Escherichia coli* strains adapted to growth on lactate. *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4639-4647.
- Huang, X. F., Liu, J. N., Lu, L. J., Peng, K. M., Yang, G. X., & Liu, J. (2016). Culture strategies for lipid production using acetic acid as sole carbon source by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource technology*, 206, 141-149.
- Huang, X. F., Shen, Y., Luo, H. J., Liu, J. N., & Liu, J. (2018). Enhancement of extracellular lipid production by oleaginous yeast through preculture and sequencing batch culture strategy with acetic acid. *Bioresource technology*, 247, 395-401.
- Imatoukene, N., Koubaa, M., Perdrix, E., Benali, M., & Vorobiev, E. (2020). Combination of cell disruption technologies for lipid recovery from dry and wet biomass of *Yarrowia lipolytica* and using green solvents. *Process Biochemistry*, 90, 139-147.
- IPCC Special Report 2018 - Global Warming of 1.5°C.
- Jackson, R. B., Friedlingstein, P., Andrew, R. M., Canadell, J. G., Le Quéré, C. & Peters, G. P. (2019). Persistent fossil fuel growth threatens the Paris Agreement and planetary health. *Environmental Research Letters*, 14(12), 121001.
- Jacques, O., & Prosser, R. S. (2021). A probabilistic risk assessment of microplastics in soil ecosystems. *Science of the Total Environment*, 757, 143987.

- Jogl, G. & Tong, L. (2004). Crystal structure of yeast acetyl-coenzyme A synthetase in complex with AMP. *Biochemistry* 43 (6), 1425–1431.
- Kantzow, C., Mayer, A. & Weuster-Botz, D. (2015). Continuous gas fermentation by *Acetobacterium woodii* in a submerged membrane reactor with full cell retention. *Journal of biotechnology*, 212, 11-18.
- Khot, M., Raut, G., Ghosh, D., Alarcón-Vivero, M., Contreras, D., & Ravikumar, A. (2020). Lipid recovery from oleaginous yeasts: perspectives and challenges for industrial applications. *Fuel*, 259, 116292.
- Kiefer, D., Merkel, M., Lilge, L., Henkel, M. & Hausmann, R. (2021). From acetate to bio-based products: underexploited potential for industrial biotechnology. *Trends in biotechnology*, 39(4), 397-411.
- Kim, Y., Lama, S., Agrawal, D., Kumar, V. & Park, S. (2021). Acetate as a potential feedstock for the production of value-added chemicals: Metabolism and applications. *Biotechnology Advances*, 49, 107736.
- Klein, D. R. (2020). *Organic chemistry*. John Wiley & Sons.
- Kollar, R. (1997). Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJC, Ashwell G, Drgonova J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. Architecture of the yeast cell wall b-1, 6 glucan interconnects mannoprotein, b-1, 3-glucan and chitin. *J Biol Chem*, 272, 17762-17775.
- Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F., Tizard, J. H., Ali, M. S., Conolly, J. J. & Simpson, S. D. (2011). 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Applied and environmental microbiology*, 77(15), 5467-5475.
- Koubaa, M., Imatoukene, N., Drévillon, L., & Vorobiev, E. (2020). Current insights in yeast cell disruption technologies for oil recovery: A review. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 150, 107868.
- Koutinas, A. A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., & Kookos, I. K. (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, 116, 566-577.

- Kövilein, A., Kubisch, C., Cai, L., & Ochsenreither, K. (2019). Malic acid production from renewables: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(3), 513–526.
- Kumar, S. J., Kumar, G. V., Dash, A., Scholz, P., & Banerjee, R. (2017b). Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. *Algal Research*, 21, 138-147.
- Kumar, S. P., Prasad, S. R., Banerjee, R., Agarwal, D. K., Kulkarni, K. S., & Ramesh, K. V. (2017a). Green solvents and technologies for oil extraction from oilseeds. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 1-7.
- Kumar, V. & Park, S. (2018). Potential and limitations of *Klebsiella pneumoniae* as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source. *Biotechnol. Adv.* 36 (1), 150–167.
- Lamberti, F. M., Román-Ramírez, L. A., & Wood, J. (2020). Recycling of bioplastics: routes and benefits. *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 2551-2571.
- Latif, S., & Anwar, F. (2011). Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction. *Food chemistry*, 125(2), 679-684.
- Lee, J. H., Cha, S., Kang, C. W., Lee, G. M., Lim, H. G., & Jung, G. Y. (2018). Efficient conversion of acetate to 3-hydroxypropionic acid by engineered *Escherichia coli*. *Catalysts*, 8(11), 525.
- Li, Y., Chen, Y., & Wu, J. (2019). Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review. *Applied energy*, 240, 120-137.
- Li, Y., Huang, B., Wu, H., Li, Z., Ye, Q. & Zhang, Y.P. (2016). Production of succinate from acetate by metabolically engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth. Biol.* 5 (11), 1299–1307.
- Li, Y., Ghasemi Naghdi, F., Garg, S., Adarme-Vega, T. C., Thurecht, K. J., Ghafor, W. A., & Schenk, P. M. (2014). A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-9.
- Lian, J., Garcia-Perez, M., Coates, R., Wu, H., & Chen, S. (2012). Yeast fermentation of carboxylic acids obtained from pyrolytic aqueous phases for lipid production. *Bioresource technology*, 118, 177-186.
- Lie, S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37-41.

- Lim, H.G., Lee, J.H., Noh, M.H. & Jung, G.Y. (2018). Rediscovering acetate metabolism: its potential sources and utilization for biobased transformation into value-added chemicals. *J. Agric. Food Chem.* 66 (16), 3998–4006.
- Lin, H., Castro, N. M., Bennett, G. N. & San, K. Y. (2006). Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 (6), 870–874.
- Liou, J. S. C., Balkwill, D. L., Drake, G. R. & Tanner, R. S. (2005). *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(5), 2085-2091.
- Liu, D., Ding, L., Sun, J., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2016). Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds—A review. *Innovative food science & emerging technologies*, 36, 181-192.
- Liu, J., Yuan, M., Liu, J. N., Lu, L. J., Peng, K. M., & Huang, X. F. (2016). Microbial conversion of mixed volatile fatty acids into microbial lipids by sequencing batch culture strategy. *Bioresource technology*, 222, 75-81.
- Liu, J., Yuan, M., Liu, J. N., & Huang, X. F. (2017). Bioconversion of mixed volatile fatty acids into microbial lipids by *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. *Bioresource technology*, 241, 645-651.
- Luyt, A. S., & Malik, S. S. (2019). Can biodegradable plastics solve plastic solid waste accumulation?. In *Plastics to energy* (pp. 403-423). William Andrew Publishing.
- Mahmood, H., Moniruzzaman, M., Iqbal, T., & Khan, M. J. (2019). Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and value-added products. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 20, 18-24.
- Mahmood, W. M. A. W., Theodoropoulos, C., & Gonzalez-Miquel, M. (2017). Enhanced microalgal lipid extraction using bio-based solvents for sustainable biofuel production. *Green Chemistry*, 19(23), 5723-5733.



- Markande, A. R., Patel, D., & Varjani, S. (2021). A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresource Technology*, 330, 124963.
- Marshall, C. W., Ross, D. E., Fichot, E. B., Norman, R. S. & May, H. D. (2013). Long-term operation of microbial electrosynthesis systems improves acetate production by autotrophic microbiomes. *Environmental science & technology*, 47(11), 6023-6029.
- Mirpoor, S. F., Giosafatto, C. V. L., & Porta, R. (2021). Biorefining of seed oil cakes as industrial co-streams for production of innovative bioplastics. A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 259-270.
- Mohan, S. V., Nikhil, G. N., Chiranjeevi, P., Reddy, C. N., Rohit, M. V., Kumar, A. N. & Sarkar, O. (2016). Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: critical review and future perspectives. *Bioresource technology*, 215, 2-12.
- Müllner, H., & Daum, G. (2004). Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochimica Polonica*, 51(2), 323-347.
- Myung, J., Strong, N. I., Galega, W. M., Sundstrom, E. R., Flanagan, J. C., Woo, S. G., & Criddle, C. S. (2014). Disassembly and reassembly of polyhydroxyalkanoates: Recycling through abiotic depolymerization and biotic repolymerization. *Bioresource technology*, 170, 167-174.
- Novak, K. & Pflügl, S. (2018). Towards biobased industry: acetate as a promising feedstock to enhance the potential of microbial cell factories. *FEMS Microbiol. Lett.* 365(20).
- Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., & Syldatk, C. (2016). Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in microbiology*, 7, 1539.
- Oklu, N. K., Matsinha, L. C., & Makhubela, B. C. (2019). Bio-solvents: synthesis, industrial production and applications. *Solvents, Ionic Liquids and Solvent Effects*, 1-24.

- Oswald, F., Dörsam, S., Veith, N., Zwick, M., Neumann, A., Ochsenreither, K. & Syldatk, C. (2016). Sequential Mixed Cultures: From Syngas to Malic Acid. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Pal, P. & Nayak, J. (2017) Acetic acid production and purification: critical review towards process intensification. *Sep. Purif. Rev.* 46, 44–61.
- Patel, M. K., Crank, M., Dornburg, V., Hermann, B. G., Roes, A. L., Hüsing, B., & Recchia, E. (2006). Medium and long-term opportunities and risks of the biotechnological production of bulk chemicals from renewable resources.
- Patel, A., Mikes, F., & Matsakas, L. (2018). An overview of current pretreatment methods used to improve lipid extraction from oleaginous microorganisms. *Molecules*, 23(7), 1562.
- 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.
- Philip, S., Keshavarz, T. & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (3), 233–247.
- Plastics Europe, 2019. Plastics – the facts 2019, An analysis of European plastics production, demand and waste data.
- Ragsdale, S.W. & Pierce, E. (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl Pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 1873–1898.
- Raspor, P. & Goranovič, D. (2008) Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28, 101–124
- Reizer, J., Reizer, A. & Saier Jr., M. H. (1994). A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1197 (2), 133–166.
- Ranjan, A., Patil, C., & Moholkar, V. S. (2010). Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(6), 2979-2985.
- Rasapoor, M., Young, B., Brar, R., Sarmah, A., Zhuang, W. Q., & Baroutian, S. (2020). Recognizing the challenges of anaerobic digestion: Critical steps toward improving biogas generation. *Fuel*, 261, 116497.

- Ratledge, C. (1988). Biochemistry, stoichiometry, substrates and economics in: Single Cell Oil,(Ed.) RS Moreton.
- Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In *Technological advances in improved and alternative sources of lipids* (pp. 235- 291). Springer.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.
- Ratledge, C. (2014). The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems. *Biotechnology letters*, 36(8), 1557-1568.
- Ratledge, C., & Tan, K. H. (1990). Oils and fats: production, degradation and utilization by yeasts. *Yeast biotechnology and biocatalysis*, 223-254.
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology*, 51, 1-52.
- Robles-Iglesias, R., Veiga, M. C. & Kennes, C. (2021). Carbon dioxide bioconversion into single cell oils (lipids) in two reactors inoculated with *Acetobacterium woodii* and *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 52, 101668.
- Rosenboom, J. G., Langer, R., & Traverso, G. (2022). Bioplastics for a circular economy. *Nature Reviews Materials*, 7(2), 117-137.
- Saha, A., Abedin, M., & Palei, S. (2020). Genetic engineering: A tool for sustainable production of biofuel from lignocellulosic biomass. *Genetic and Metabolic Engineering for Improved Biofuel Production from Lignocellulosic Biomass*, 97-101.
- Saier Jr., M. H., (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2), 354–411.
- Samorì, C., Martinez, G. A., Bertin, L., Pagliano, G., Parodi, A., Torri, C., & Galletti, P. (2022). PHB into PHB: Recycling of polyhydroxybutyrate by a tandem “thermolytic distillation-microbial fermentation” process. *Resources, Conservation and Recycling*, 178, 106082.

- Schiel-Bengelsdorf, B. & Dürre, P. (2012). Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS letters*, 586(15), 2191-2198.
- Shi, I.Y., Stansbury, J. & Kuzminov, A., (2005). A defect in the acetyl coenzyme A acetate pathway poisons recombinational repair-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187 (4), 1266–1275.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2005). Determination of extractives in biomass. Laboratory analytical procedure (LAP), 1617, 1-9.
- Socol, C. R., Neto, C. J. D., Socol, V. T., Sydney, E. B., da Costa, E. S. F., Medeiros, A. B. P., & de Souza Vandenberghe, L. P. (2017). Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresource Technology*, 223, 259-268.
- Song, H. S., Seo, H. M., Jeon, J. M., Moon, Y. M., Hong, J. W., Hong, Y. G., ... & Yang, Y. H. (2018). Enhanced isobutanol production from acetate by combinatorial overexpression of acetyl-CoA synthetase and anaplerotic enzymes in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(8), 1971-1978.
- Steiger, M. G., Blumhoff, M. L., Mattanovich, D., Sauer, M., 2013. Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Front. Microbiol.* 4, 23.
- Strategy Bioeconomy. A sustainable bioeconomy for Europe: strengthening the connection between economy, society and the environment. In: European commission; 2018. Brussels, Belgium.
- Straub, M., Demler, M., Weuster-Botz, D. & Dürre, P. (2014). Selective enhancement of autotrophic acetate production with genetically modified *Acetobacterium woodii*. *Journal of biotechnology*, 178, 67-72.
- Tanzi, C. D., Vian, M. A., & Chemat, F. (2013). New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: a green clean and scalable process. *Bioresource technology*, 134, 271-275.
- Tanzi, C. D., Vian, M. A., Ginies, C., Elmaataoui, M., & Chemat, F. (2012). Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. *Molecules*, 17(7), 8196-8205.
- Toplisek, T., & Gustafson, R. (1995). Cleaning with D-Limonenes: A substitute for chlorinated solvents. *Precision cleaning*, 3(8), 17-20.

- UN Emissions Gap Report 2019 (November 2019), by UN Environment Programme (UNEP).
- Valgepea, K., de Souza Pinto Lemgruber, R., Abdalla, T., Binos, S., Takemori, N., Takemori, A. & Marcellin, E. (2018). H<sub>2</sub> drives metabolic rearrangements in gas-fermenting *Clostridium autoethanogenum*. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 1-15.
- Vidra, A. & Németh, A. (2018) Bio-produced acetic acid: a review. *Period. Polytech. Chem. Eng.* 62, 245–246.
- Viot, M., Tomao, V., Colnagui, G., Visinoni, F., & Chemat, F. (2007). New microwave-integrated Soxhlet extraction: an advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of chromatography A*, 1174(1-2), 138-144.
- Wendisch, V. F., Brito, L. F., Lopez, M. G., Hennig, G., Pfeifenschneider, J., Sgobba, E. & Veldmann, K. H. (2016). The flexible feedstock concept in industrial biotechnology: metabolic engineering of *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and yeast strains for access to alternative carbon sources. *Journal of biotechnology*, 234, 139-157.
- Wierckx, N., Prieto, M. A., Pomposiello, P., de Lorenzo, V., O'Connor, K., & Blank, L. M. (2015). Plastic waste as a novel substrate for industrial biotechnology. *Microbial biotechnology*, 8(6), 900.
- World Bank 2018. *Global Economic Prospects*, June 2018: The Turning of the Tide ? (Washington, DC: World Bank)
- Xavier, M. C. A., Coradini, A. L. V., Deckmann, A. C., & Franco, T. T. (2017). Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. *Biochemical Engineering Journal*, 118, 11-19.
- Xu, L., Brilman, D. W. W., Withag, J. A., Brem, G., & Kersten, S. (2011b). Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: energy balance analysis. *Bioresource technology*, 102(8), 5113-5122.
- Xu, Z. et al. (2011a) Acetic and propionic acids. In *Comprehensive Biotechnology* (2nd edn) (Murray Moo-Young, M., ed.), pp. 189–199, Academic Press

- Xu, X., Xie, M., Zhao, Q., Xian, M., & Liu, H. (2018). Microbial production of mevalonate by recombinant *Escherichia coli* using acetic acid as a carbon source. *Bioengineered*, 9(1), 116-123.
- Xue, S.J. Chi, Z. Zhang, Y. Li, Y.F. Liu, G.L. Jiang, H. Hu, Z. & Chi, Z.M. (2018) Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 38, 1049–1060.
- Yamamoto, I., & Ishimoto, M. (1981). Oxidation of lactate in comparison with that of glucose in nitrate respiration of *Escherichia coli*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 27(1), 11-20.
- Yang, H., Huang, B., Lai, N., Gu, Y., Li, Z., Ye, Q., & Wu, H. (2019). Metabolic engineering of *Escherichia coli* carrying the hybrid acetone-biosynthesis pathway for efficient acetone biosynthesis from acetate. *Microbial cell factories*, 18(1), 1-9.
- Yang, S., Li, S., & Jia, X. (2019). Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate from acetate by engineered *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(6), 793-800.
- Yang, J., & Nie, Q. (2016). Engineering *Escherichia coli* to convert acetic acid to  $\beta$ -caryophyllene. *Microbial cell factories*, 15(1), 1-9.
- Yang, H., Zhang, C., Lai, N., Huang, B., Fei, P., Ding, D., & Wu, H. (2020). Efficient isopropanol biosynthesis by engineered *Escherichia coli* using biologically produced acetate from syngas fermentation. *Bioresource technology*, 296, 122337.
- Yenkie, K. M., Wu, W., & Maravelias, C. T. (2017). Synthesis and analysis of separation networks for the recovery of intracellular chemicals generated from microbial-based conversions. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-22.
- Yu, X., Dong, T., Zheng, Y., Miao, C., & Chen, S. (2015). Investigations on cell disruption of oleaginous microorganisms: hydrochloric acid digestion is an effective method for lipid extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(5), 730-737.
- Zainuddin, M. F., Fai, C. K., Ariff, A. B., Rios-Solis, L., & Halim, M. (2021). Current pretreatment/cell disruption and extraction methods used to improve

intracellular lipid recovery from oleaginous yeasts. *Microorganisms*, 9(2), 251.

Zheng, Y., Chi, Z., Ahring, B. K., & Chen, S. (2012). Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biofuel production: ammonia's effect. *biomass and bioenergy*, 37, 114-121.

Zoghbi, L., Argeiti, C., Skliros, D., Flemetakis, E., Koutinas, A., Pateraki, C., & Ladakis, D. (2023). Circular PHB production via *Paraburkholderia sacchari* cultures using degradation monomers from PHB-based post-consumer bioplastics as carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, 191, 108808.