



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

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε διαφορετικές πηγές αζώτου  
με τη χρήση υδρολύματος αποβλήτων καφέ

**Ιωάννης Μάριος Κ. Ηλιόπουλος**

Επιβλέπων καθηγητής:  
Κουτίνας Απόστολος, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ 2024**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε διαφορετικές πηγές αζώτου  
με τη χρήση υδρολύματος αποβλήτων καφέ

Study on microbial lipids production in different nitrogen sources  
using hydrolysate derived from spent coffee grounds

**Ιωάννης Μάριος Κ. Ηλιόπουλος**

Εξεταστική επιτροπή:

Κουτίνας Απόστολος, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

Τσιρώνη Θεοφανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

## Μελέτη παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε διαφορετικές πηγές αζώτου με τη χρήση υδρολύματος αποβλήτων καφέ

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

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εδώ και πολλά χρόνια, ο πλανήτης μας βιώνει πολλές προκλήσεις οι οποίες απαιτείται να αντιμετωπιστούν. Μία από αυτές, είναι η ελάττωση της χρήσης ορυκτών πόρων αντικαθιστώντας τους με ανανεώσιμες πηγές άνθρακα. Η σταδιακή μετάβαση στην κυκλική οικονομία και η ανάγκη αξιοποίησης παράπλευρων ρευμάτων μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή βιογενών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τα μικροβιακά λιπίδια (Single Cell Oils, SCOs) αποτελούν μια τέτοια κατηγορία προϊόντων, η παραγωγή των οποίων ήταν το αντικείμενο της παρούσας μελέτης.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων με τη χρήση του μικροοργανισμού *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, μιας ελαιογόνου ζύμης που χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή βιοκαυσίμων λόγω της ικανότητάς της να αναπτύσσεται σε πληθώρα υποστρωμάτων και να παράγει τριακυλογλυκερόλες σε υψηλές αποδόσεις. Ο μικροοργανισμός αυτός καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, εξετάζοντας διαφορετικές πηγές αζώτου ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση στην ανάπτυξή του. Χρησιμοποιήθηκαν τόσο οργανικές πηγές αζώτου (ουρία, corn steep liquor, πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης) όσο και ανόργανες (θειικό αμμώνιο, χλωριούχο αμμώνιο, νιτρικό κάλιο, νιτρώδες νάτριο) σε ασυνεχείς ζυμώσεις και κατόπιν, ακολούθησε ένα δεύτερο στάδιο ασυνεχών ζυμώσεων, όπου ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε αρχικά σε μίγμα εμπορικών σακχάρων κατ' αναλογία των υδρολύματος αποβλήτου καφέ και στη συνέχεια σε υπόστρωμα που προέκυψε από την ενζυμική υδρόλυση του αποβλήτου αυτού. Σε αυτή την περίπτωση, ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκαν η ουρία, το corn steep liquor (CSL) και το θειικό αμμώνιο. Τέλος, το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 αναπτύχθηκε σε ημισυνεχή ζύμωση με εμπορικά σάκχαρα σε ποσοστό ανάλογο με αυτά της σύστασης του υδρολύματος αποβλήτου καφέ και πηγή αζώτου την ουρία.

Μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου στις ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη παρατηρήθηκε ικανοποιητική ανάπτυξη του μικροοργανισμού

στις περισσότερες πηγές ενώ στην περίπτωση των νιτρικών αλάτων (νιτρικό κάλιο, νιτρώδες νάτριο) δεν υπήρξε κατανάλωση. Σε όλα τα παραπάνω πειράματα, πραγματοποιήθηκε ανάκτηση του μικροβιακού λίπους με τη μέθοδο Folch, με τα καλύτερα αποτελέσματα να εντοπίζονται στις ζυμώσεις με το υδρόλυμα αποβλήτου καφέ, με εύρος τιμών μεταξύ 11-15 g/L μικροβιακών λιπιδίων και λιποσυσσώρευση 26-38%. Τα λιπαρά οξέα από τα οποία αποτελούνταν τα μικροβιακά λιπίδια ήταν κυρίως τα C16:0, C18:0, C18:1, C18:2.

**Επιστημονική Περιοχή:** Βιομηχανική Βιοτεχνολογία

**Λέξεις κλειδιά:** Απόβλητα καφέ, πηγές αζώτου, ζύμωση, μικροβιακά λιπίδια

## **Study on microbial lipids production in different nitrogen sources using hydrolysate derived from spent coffee grounds**

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

### **ABSTRACT**

For many years, our planet has been facing numerous challenges that need to be addressed. One of these is the reduction of fossil resource usage by replacing them with renewable carbon sources. The gradual transition to a circular economy and the need to utilize by-products could lead to the production of high-value bio-based products. Microbial lipids (Single Cell Oils, SCOs) represent such a category of products, and their production was the subject of this study.

More specifically, SCOs production by oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 was carried out, a lipid-producing yeast that is widely used for biofuel production due to its ability to grow on a variety of substrates and produce triacylglycerols at high yields. Firstly, *C. curvatus* was cultivated on a substrate with glucose as the carbon source, examining different nitrogen sources to determine their effect on its growth. Both organic sources (urea, corn steep liquor, peptone, yeast extract) and inorganic sources (ammonium sulfate, ammonium chloride, potassium nitrate, sodium nitrite) were used in batch fermentations. Subsequently, a second stage of batch fermentations was conducted, where the microorganism was initially cultivated in a mixture of commercial sugars that simulated the hydrolysate from spent coffee grounds, followed by the substrate derived from the enzymatic hydrolysis of the aforementioned by-product. In this case, urea, corn steep liquor and ammonium sulfate were used as nitrogen sources. Finally, *C. curvatus* ATCC 20509 was cultivated in fed-batch fermentation with commercial sugars at a ratio corresponding to that of spent coffee grounds hydrolysate and urea as the nitrogen source.

Among the different nitrogen sources that were used in batch fermentations with glucose as carbon source, it was observed significant microbial growth while in the case of nitrates (potassium nitrate, sodium nitrite), no consumption was detected. In all the above experiments, microbial lipids recovery was performed by the Folch method, with the best results found in fermentations using spent coffee grounds hydrolysate, with

values ranging from 11 to 15 g/L of microbial lipids and 26 to 38% of lipid accumulation. The fatty acids that comprised the microbial lipids were primarily C16:0, C18:0, C18:1 and C18:2.

**Scientific area:** Industrial Biotechnology

**Keywords:** Spent Coffee Grounds, nitrogen sources, fermentation, microbial lipids

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μηχανικής & Επεξεργασίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023-2024, στα πλαίσια της συμμετοχής μου στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων: Επεξεργασία, Συντήρηση και Βιοτεχνολογικές Διεργασίες Τροφίμων – Ανάπτυξη Προϊόντων Βιο-οικονομίας».*

*Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου, Καθηγητή κ. Αποστόλη Κουτίνα που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω τη μελέτη μου στο εργαστήριό του καθώς και για την εξαιρετική μας συνεργασία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Σεραφείμ Παπανικολάου και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Θεοφανία Τσιρώνη.*

*Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα και φίλο Πετρόπουλο Αποστόλη για τη συνεργασία μας και την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης των πειραμάτων μου, καθώς και τη μεταδιδάκτορα Ελένη Στυλιανού για τις σημαντικές συμβουλές της.*

*Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη σημαντική βοήθεια τους σε οτιδήποτε χρειαζόμουν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και για το εξαιρετικό κλίμα μεταξύ μας.*

*Τέλος, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και τους φίλους μου για την κατανόηση τους.*

---

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

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iii
ABSTRACT.....	v
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	vii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	xiii
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	xiv
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Ανανεώσιμες πηγές άνθρακα και κλιματική αλλαγή.....	1
1.2 Αξιοποίηση αποβλήτων.....	3
1.2.1 Απόβλητα καφέ.....	6
1.2.1.1. Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας από απόβλητα καφέ.....	7
1.3 Λιπίδια.....	11
1.3.1 Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και βιοτεχνολογικές εφαρμογές τους ...	12
2. Σκοπός μελέτης.....	18
3. Υλικά και μέθοδοι.....	19
3.1 Μικροοργανισμός.....	19
3.2 Προκαλλιέργειες.....	19
3.3 Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε τρυβλία Petri.....	19
3.4 Παρασκευή θρεπτικού μέσου για την παραγωγή SCOs σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες.....	20
3.4.1 Παρασκευή υδρολύματος αποβλήτου καφέ.....	21
3.5 Παρασκευή θρεπτικού μέσου για την παραγωγή SCOs σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα.....	22
3.6 Αναλυτικές μέθοδοι.....	23
3.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός βιομάζας.....	23
3.6.2 Προσδιορισμός σακχάρων.....	24
3.6.3 Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων.....	24



3.6.4 Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου .....	25
3.6.5 Ποσοτικός προσδιορισμός SCOs .....	25
3.6.6 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων .....	26
4. Αποτελέσματα και συζήτηση .....	28
4.1 Ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και αξιολόγηση διαφορετικών πηγών αζώτου.....	28
4.1.1 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία.....	28
4.1.2 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL .....	29
4.1.3 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη.....	30
4.1.4 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης.....	31
4.1.5 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	32
4.1.6 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το χλωριούχο αμμώνιο, NH <sub>4</sub> Cl.....	34
4.1.7 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων στις ασυνεχείς ζυμώσεις με διαφορετικές πηγές αζώτου .....	35
4.2 Ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα εμπορικά σάκχαρα σε αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ .....	35
4.2.1 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία.....	36
4.2.2 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL .....	37
4.2.3 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο .....	38
4.2.4 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων στις ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα εμπορικά σάκχαρα σε αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ .....	38
4.3 Ασυνεχείς ζυμώσεις σε υδρόλυμα αποβλήτου καφέ.....	39
4.3.1 Παραγωγή υδρολύματος αποβλήτου καφέ πλούσιου σε σάκχαρα .....	39
4.3.2 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία.....	40
4.3.3 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL .....	41
4.3.4 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο .....	41
4.3.5 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων στις ασυνεχείς ζυμώσεις με υπόστρωμα υδρόλυμα αποβλήτου καφέ .....	52

4.4 Ημι-συνεχής ζύμωση με πηγή άνθρακα εμπορικά σάκχαρα σε αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ .....	53
4.4.1 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων στην ημι-συνεχή ζύμωση με πηγή άνθρακα τα εμπορικά σάκχαρα κατ' αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ .....	54
5. Συμπεράσματα.....	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1:</b> Χημική σύσταση των SCGs .....	7
<b>Πίνακας 2:</b> Σύσταση μίγματος αλάτων και ιχνοστοιχείων του υποστρώματος.....	21
<b>Πίνακας 3:</b> Αποτελέσματα διαφορετικών πηγών αζώτου στις ασυνεχείς ζυμώσεις σε γλυκόζη .....	28
<b>Πίνακας 4:</b> Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων σε ασυνεχείς ζυμώσεις με διαφορετικές πηγές αζώτου .....	35
<b>Πίνακας 5:</b> Αποτελέσματα διαφορετικών πηγών αζώτου στις ασυνεχείς ζυμώσεις σε εμπορικά σάκχαρα σε αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ.....	36
<b>Πίνακας 6:</b> Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων σε ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα εμπορικά σάκχαρα σε αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ.....	39
<b>Πίνακας 7:</b> Αποτελέσματα διαφορετικών πηγών αζώτου στις ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα υδρολύματος αποβλήτου καφέ.....	40
<b>Πίνακας 8:</b> Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων σε ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα υδρόλυμα καφέ.....	52
<b>Πίνακας 9:</b> Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων στην ημισυνεχή ζύμωση .....	54

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία. Κατανάλωση γλυκόζης και FAN, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων .....	29
<b>Σχήμα 2:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL. Κατανάλωση γλυκόζης και FAN, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων .....	30
<b>Σχήμα 3:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη. Κατανάλωση γλυκόζης και FAN, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων .....	31
<b>Σχήμα 4:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης. Κατανάλωση γλυκόζης και FAN, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων .....	31
<b>Σχήμα 5:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο. Κατανάλωση γλυκόζης και αμμωνιακού αζώτου, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων .....	33
<b>Σχήμα 6:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το χλωριούχο αμμώνιο. Κατανάλωση γλυκόζης και αμμωνιακού αζώτου, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων .....	34
<b>Σχήμα 7:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία. (A) Κατανάλωση FAN και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (B) Κινητική κατανάλωσης εμπορικών σακχάρων.....	37
<b>Σχήμα 8:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL. (A) Κατανάλωση FAN και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (B) Κινητική κατανάλωσης εμπορικών σακχάρων.....	38
<b>Σχήμα 9:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο. (A) Κατανάλωση αμμωνιακού αζώτου και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (B) Κινητική κατανάλωσης εμπορικών σακχάρων .....	38
<b>Σχήμα 10:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία. (A) Κατανάλωση FAN και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (B) Κινητική κατανάλωσης σακχάρων του υδρολύματος .....	40
<b>Σχήμα 11:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL. (A) Κατανάλωση FAN και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (B) Κινητική κατανάλωσης σακχάρων του υδρολύματος .....	41
<b>Σχήμα 12:</b> Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο. (A) Κατανάλωση αμμωνιακού αζώτου και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (B) Κινητική κατανάλωσης σακχάρων του υδρολύματος.....	52
<b>Σχήμα 13:</b> Ημι-συνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία. (A) Κατανάλωση FAN και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (B) Κινητική κατανάλωσης εμπορικών σακχάρων.....	53

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1:</b> Κατηγορίες Βιοκαυσίμων (Rial, 2024).....	3
<b>Εικόνα 2:</b> Στερεά αστικά απόβλητα ανά άτομο στην Ε.Ε, 2022 (European Commission, Eurostat, 2024c) .....	5
<b>Εικόνα 3:</b> Μονοπάτια παραγωγής προϊόντων από SCGs (Kourmentza et al., 2018) .	11
<b>Εικόνα 4:</b> Μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής τριγλυκεριδίων (TAGs) στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Xu et al., 2013) .....	16
<b>Εικόνα 5.</b> Παρατήρηση προκαλλιέργειας στο μικροσκόπιο μετά από 24h.....	20
<b>Εικόνα 6.</b> Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα Bioengineering, RALF Advanced 6,7 L .....	23
<b>Εικόνα 7.</b> Μικροβιακό έλαιο μετά την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη.....	26

## ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

ACC	Καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA
ACL	ATP – κιτρική λυάση
ACP	Ακυλοφόρος πρωτεΐνη
AMP	Μονοφωσφορική αδενοσίνη
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
CS	Σπερόδεσμα
CSL	Corn Steep Liquor
DAG	Διακυλογλυκερόλη
DCW	Ξηρή κυτταρική βιομάζα
DFSCGs	Απόβλητα καφέ χωρίς λιπίδια
DSCGs	Αποξηραμένα απόβλητα καφέ
EPA	Εικοσιπεντανοϊκό οξύ
FAMEs	Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων
FAN	Ελεύθερες αμινομάδες
FAS	Συνθετάση λιπαρών οξέων
GC	Αέρια χρωματογραφία
GLA	γ-λινολενικό οξύ
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
ICDH	Ισοκιτρική αφυδρογονάση
IMP	Μονοφωσφορική ινσίνη
MDH	Μηλική αφυδρογονάση
ME	Μηλικό ένζυμο
MSW	Αστικά στερεά απορρίμματα
NADPH	Φωσφορικό νικοτιναμίδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
OFMSW	Οργανικό κλάσμα αστικών στερεών απορριμμάτων
PUFAs	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
SCGs	Απόβλητα καφέ

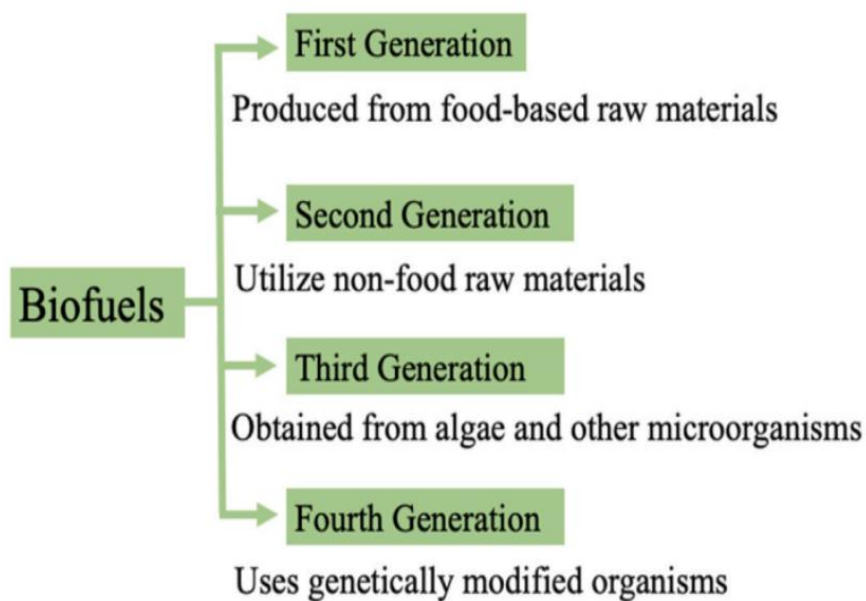
# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ανανεώσιμες πηγές άνθρακα και κλιματική αλλαγή

Σήμερα, ο πλανήτης μας βρίσκεται αντιμέτωπος με πολλές προκλήσεις. Η χρήση ορυκτών καυσίμων ως κύρια πηγή ενέργειας στις περισσότερες χώρες έχει οδηγήσει σε αρκετές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, όπως η ατμοσφαιρική ρύπανση και η υπερθέρμανση του πλανήτη. Σε παγκόσμιο επίπεδο, γίνονται προσπάθειες για την αποφυγή των συνεπειών αυτών μέσω της σύναψης διεθνών συμφωνιών (Martins et al., 2019). Έπειτα από μακροχρόνιες έρευνες, η επιστημονική κοινότητα κατέληξε ότι οι ανθρωπογενείς εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου (greenhouse gas emissions) είναι η κύρια αιτία αύξησης της θερμοκρασίας του πλανήτη τα τελευταία 250 χρόνια (European Commission, Eurostat, 2024a). Ενδεικτικά, το 2021 οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου στην Ευρωπαϊκή Ένωση ήταν 3,5 δισεκατομμύρια τόνοι ισοδύναμου διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub> equivalent), με τον στόχο για το 2030 να είναι η μείωση σε ποσοστό 55% και για το 2050 σε ποσοστό 100% (European Commission, Eurostat, 2024a). Η μεγαλύτερη μείωση, περίπου 55 – 68%, έχει σημειωθεί στην Εσθονία, στη Λετονία, στη Λιθουανία και στη Ρουμανία (European Commission, Eurostat, 2024a). Για την επίτευξη του μηδενισμού των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα μέχρι το 2050, που είναι σύμφωνος με τους στόχους που θεσπίστηκαν στη Συμφωνία του Παρισιού, η παγκόσμια ενεργειακή στρατηγική στοχεύει να μηδενίσει τις εκπομπές που προέρχονται από τον τομέα της ενέργειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος της καταναλώνεται στις μεταφορές, στην παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας καθώς και στον βιομηχανικό τομέα. Για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου, οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας αποτελούν μια ενδεχόμενη εναλλακτική λύση (Maka et al., 2024). Χαρακτηριστικά παραδείγματα εναλλακτικών πηγών ενέργειας με σκοπό την μείωση της υπερθέρμανσης του πλανήτη, είναι το υδρογόνο, το φυσικό αέριο, το συνθετικό αέριο (syngas) και τα βιοκαύσιμα, με τα τελευταία να είναι η φιλικότερη προς το περιβάλλον πηγή ενέργειας (Nigam & Singh, 2011). Τα βιοκαύσιμα παράγονται από ανανεώσιμες πηγές, όπως γεωργικά υπολείμματα και έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν σημαντικά τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, ειδικά με τη χρήση τους στις μεταφορές και τη βιομηχανία (Rial, 2024). Τα βιοκαύσιμα μπορεί να είναι πρώτης γενιάς (first-generation biofuels), στα οποία πρώτη ύλη είναι σάκχαρα και φυτικά έλαια, δεύτερης γενιάς (second-generation biofuels), στα οποία πρώτη ύλη είναι

υπολείμματα λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας και αγροτοβιομηχανικά απόβλητα, και τρίτης γενιάς (third-generation biofuels) όπου παράγονται από αυτότροφους μικροοργανισμούς, όπως τα φύκη (Saladini et al., 2016). Επιπλέον, υπάρχουν και τα βιοκαύσιμα τέταρτης γενιάς (fourth-generation biofuels), τα οποία αποτελούν μια αξιοσημείωτη ανακάλυψη στην τεχνολογία βιοκαυσίμων χρησιμοποιώντας γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς για την παραγωγή τους (Rial, 2024). Η αποφυγή των βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς κρίνεται απαραίτητη καθώς, λόγω των εδώδιμων πρώτων υλών που απαιτούνται για την παραγωγή τους, επιδεινώνεται το σημαντικό πρόβλημα του ανταγωνισμού με τη βιομηχανία τροφίμων, τόσο ως προς το οικονομικό σκέλος όσο και ως προς την ζήτηση τροφίμων για ανθρώπινη κατανάλωση (Fiorentino et al., 2016; Bardhan et al., 2015). Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη στα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς υπάρχει σε σημαντικές ποσότητες και μπορεί να δώσει λύση στο πρόβλημα ανταγωνισμού με τη βιομηχανία τροφίμων. Παρ' όλ' αυτά, η μετατροπή της σε τελικά προϊόντα είναι περισσότερο πολύπλοκη σε σχέση με αυτή των υποστρωμάτων της πρώτης γενιάς βιοκαυσίμων, καθώς το λιγνοκυτταρινούχο κλάσμα χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα και αποτελείται από κυτταρίνη (30 - 50%), ημικυτταρίνες (20 - 40%) και λιγνίνη (15 - 25%). Για να χρησιμοποιηθούν τα C<sub>5</sub> και C<sub>6</sub> σάκχαρα από τα οποία αποτελούνται η κυτταρίνη και οι ημικυτταρίνες είναι αρχικά απαραίτητος ο αποπολυμερισμός της λιγνίνης, η οποία βρίσκεται στα κενά που σχηματίζονται μεταξύ κυτταρίνης και ημικυτταρινών δημιουργώντας έτσι μια άκαμπτη δομή που εμποδίζει την υδρόλυσή τους (Sheldon, R., 2011; Fiorentino et al., 2016). Συνοπτικά, στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται οι προαναφερθείσες κατηγορίες βιοκαυσίμων.





**Εικόνα 1:** Κατηγορίες Βιοκαυσίμων (Rial, 2024)

Η αξιοποίηση της βιομάζας αντί των ορυκτών για την παραγωγή χημικών και καυσίμων στα πλαίσια ενός βιοδιύλιστηρίου, εκτιμάται ότι περιλαμβάνει προοπτικές μείωσης της ατμοσφαιρικής ρύπανσης, των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα και μη ανακυκλώσιμων προϊόντων ευρείας χρήσης (Fiorentino et al., 2016). Παρά τα οφέλη, η μετάβαση σε εναλλακτικές πηγές ενέργειας αντιμετωπίζει πολλές προκλήσεις, όπως το υψηλό αρχικό κόστος και η ανάγκη για υποδομές. Συνεπώς, απαιτείται μια ολιστική προσέγγιση, με συνεργασία των κυβερνήσεων, της βιομηχανίας και των πολιτών. Η υιοθέτηση ευνοϊκών πολιτικών μέτρων, η παροχή οικονομικών κινήτρων, οι επενδύσεις σε καινοτόμες τεχνολογίες και η δημόσια εκπαίδευση είναι μείζονος σημασίας για τη στροφή σε εναλλακτικές πηγές ενέργειας (Rial, 2024).

## 1.2 Αξιοποίηση αποβλήτων

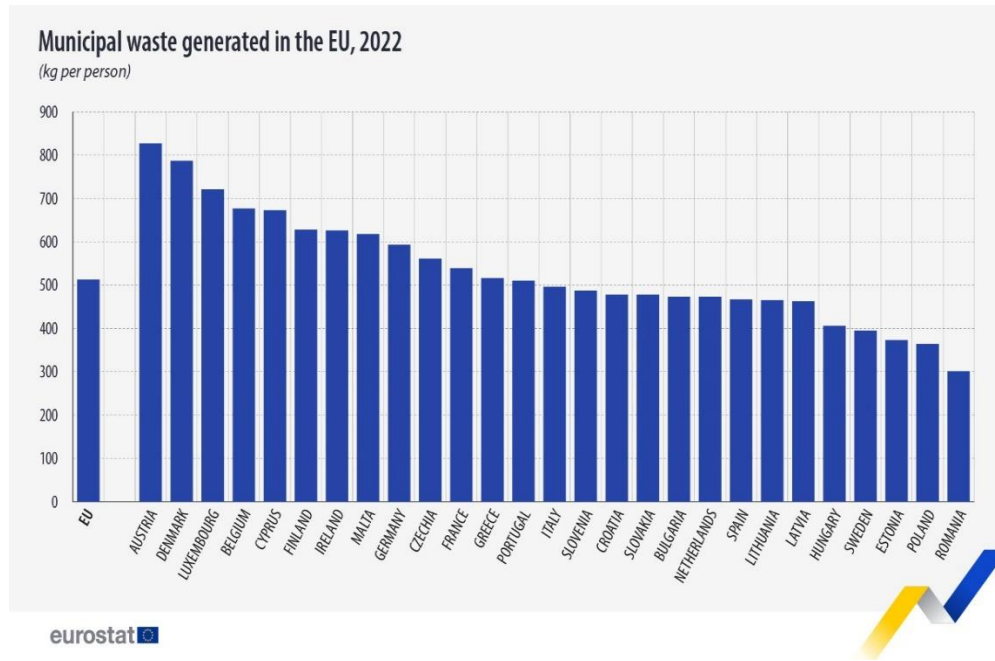
Η μετάβαση από μια οικονομία που βασίζεται στους ορυκτούς πόρους σε μια οικονομία που βασίζεται σε βιογενή προϊόντα είναι αδιαμφισβήτητα πολύπλοκη. Σημαντική βοήθεια σε αυτή τη δυσκολία παρέχει η λευκή βιοτεχνολογία, καθιστώντας τις βιομετατροπές πρώτων υλών με τη δράση μικροοργανισμών σε χρήσιμα προϊόντα, ως βασική ιδέα κατά την ανάπτυξη ενός βιοδιύλιστηρίου. Οι ροές των παράπλευρων ρευμάτων στις υπάρχουσες βιομηχανίες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανανεώσιμες πηγές για την παραγωγή πρώτων υλών, λειτουργώντας ως υποστρώματα για τις διάφορες ζυμώσεις που θα οδηγήσουν στην παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (Koutinas et al., 2014). Αυτή η μετάβαση προς την κυκλική

οικονομία φαίνεται να αποτελεί μονόδρομο, καθώς η ζήτηση για καύσιμα και χημικά προϊόντα έχει αυξηθεί εξαιτίας της ραγδαίας αύξησης του πληθυσμού του πλανήτη, με συνέπεια να καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη βιώσιμων και καινοτόμων στρατηγικών για τη βιομηχανία. Τα παραπροϊόντα και τα απόβλητα των βιομηχανιών αναδεικνύονται ως εξαιρετικά χρήσιμα, λόγω της αφθονίας τους σε παγκόσμιο επίπεδο καθώς και του πολυποίκιλου περιεχομένου τους σε διάφορα συστατικά (Lin et al., 2013). Ένας ακόμα παράγοντας που καθιστά την αξιοποίηση των αποβλήτων απαραίτητη στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας, είναι ότι μεγάλες ποσότητες αυτών απορρίπτονται στο περιβάλλον και σε χώρους υγειονομικής ταφής, παρόλο που ικανοποιούν τις προϋποθέσεις για να αξιοποιηθούν και να οδηγήσουν σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας (Arias et al., 2023).

Τα απόβλητα μπορούν να ταξινομηθούν σε αγροτικά (γεωργικά), βιομηχανικά, καθώς και αστικά στερεά απορρίμματα, που μπορούν με τη σειρά τους να διαιρεθούν στο οργανικό κλάσμα, σε γυάλινα, πλαστικά, χάρτινα απορρίμματα ή/και άλλες υποκατηγορίες (Lin et al., 2013). Ένα εξίσου σημαντικό απόβλητο είναι τα τρόφιμα. Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO), τα απόβλητα που ανήκουν στην κατηγορία των τροφίμων ανήλθαν σε 1052 εκατομμύρια t το 2022, που αντιστοιχούν σε 132 kg κατά κεφαλήν ανά έτος, με το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών να προέρχονται από τα νοικοκυριά (FAO, 2024). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, περίπου 58 εκατομμύρια t αποβλήτων τροφίμων (food waste) που αντιστοιχούν σε 131 kg ανά κάτοικο καταγράφονται ετησίως, με το 16% των συνολικών εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου να προκαλούνται από αυτά (European Commission, 2024).

Ως αστικά στερεά απορρίμματα (Municipal Solid Waste, MSW) ορίζονται «τα απόβλητα που συλλέγονται από ή για τις δημοτικές αρχές και απορρίπτονται μέσω συστημάτων διαχείρισης αποβλήτων και αποτελούνται κυρίως από απόβλητα νοικοκυριών και απόβλητα παρόμοιας σύστασης που προέρχονται από καταστήματα, γραφεία και δημόσιους φορείς» (European Commission, Eurostat, 2023). Για το 2022, 513 kg αστικών στερεών απορριμμάτων αντιστοιχούσαν σε κάθε κάτοικο στην Ευρωπαϊκή Ένωση, με τον μεγαλύτερο αριθμό να σημειώνεται στην Αυστρία με 835 kg ανά κάτοικο και το 48% αυτών να οδηγείται προς ανακύκλωση. Στην Ελλάδα, 303 kg MSW αντιστοιχούσαν ανά κάτοικο κατά το έτος 1995, ενώ το 2021 ο αριθμός αυτός ανήλθε στα 509 kg MSW (European Commission, Eurostat, 2024b). Ενδεικτικά, στην

Εικόνα 2 παρουσιάζεται η ποσότητα MSW ανά άτομο σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το 2022.



**Εικόνα 2:** Στερεά αστικά απόβλητα ανά άτομο στην Ε.Ε, 2022 (European Commission, Eurostat, 2024c)

Το οργανικό κλάσμα των MSW (Organic Fraction of Municipal Solid Waste, OFMSW) αποτελείται κυρίως από σάκχαρα, πρωτεΐνες, λίπη/έλαια και μέταλλα (Maina et al., 2017) και κατόπιν επεξεργασίας (αλκαλική, όξινη, υδροθερμική προεπεξεργασία ή/και ενζυμική υδρόλυση) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως βιοαιθανόλης (Matsakas et al., 2017). Σύμφωνα με την μελέτη των Barampouti et al. (2019), από 1 t OFMSW μπορούν να προκύψουν 26 kg ελαίου και με μετεστεροποίηση να παραχθούν 25 L βιοντίζελ. Από την υπόλοιπη ποσότητα του OFMSW, λαμβάνονται 51 kg γλυκόζης από τα οποία παράγονται 30 L βιοαιθανόλης. Αξιοσημείωτη είναι και η παραγωγή βιοαερίου μέσω αναερόβιας χώνευσης. Αρχικά, πραγματοποιείται υδρόλυση των σύνθετων μορίων σε απλούστερα και κατόπιν, ακολουθεί η ζύμωση όπου παράγεται μίγμα αερίων  $H_2$  και  $CO_2$ . Τέλος, τα μεθανογόνα βακτήρια μετατρέπουν αυτό το μίγμα σε  $CO_2$  και  $CH_4$  (βιοαέριο) (Yaashikaa et al., 2020).

### 1.2.1 Απόβλητα καφέ

Ο καφές είναι ένα από τα πιο δημοφιλή ροφήματα στον κόσμο και το δεύτερο μεγαλύτερο εμπόρευμα, μετά το πετρέλαιο. Καλλιεργείται σε περίπου 80 χώρες του πλανήτη και η χρήση του απασχολεί έναν μεγάλο αριθμό επιχειρήσεων παγκοσμίως (Murthy et al., 2012). Τον Ιούλιο του 2024, οι εξαγωγές κάθε μορφής καφέ, ανήλθαν σε 2,43 εκατομμύρια σακούλες στην Ασία και την Ωκεανία, σε 1,75 εκατομμύρια σακούλες στην Αφρική, σε 4.85 εκατομμύρια σακούλες στη Νότια Αμερική και σε 1,76 εκατομμύρια σακούλες στο Μεξικό και στην Κεντρική Αμερική (ICO, 2024). Η ταχέως αυξανόμενη κατανάλωση καφέ οδηγεί στη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων στερεών υπολειμμάτων, που αποτελούν τα απόβλητα καφέ (Spent Coffee Grounds, SCGs) (Kourmentza et al., 2018).

Σύμφωνα με τους Mussatto et al. (2011), το σπερόδερμα (coffee silverskin, CS) και τα SCGs είναι τα δυο κύρια απόβλητα των βιομηχανιών καφέ. Το CS είναι το σύνολο κόκκων καφέ που λαμβάνονται ως υποπροϊόν κατά το καβούρδισμα και περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις σε διαλυτές διαιτητικές ίνες (soluble dietary fiber) με αντιοξειδωτική δράση. Από την άλλη, τα SCGs είναι υπολείμματα που λαμβάνονται κατά την επεξεργασία ακατέργαστου καφέ υπό μορφή σκόνης με ζεστό νερό ή ατμό για στιγμιαία παρασκευή καφέ και έχουν υψηλό ποσοστό υγρασίας, οργανικά συστατικά και οξύτητα και αποτελούν το κύριο ποσοστό αποβλήτων σε σχέση με τα CS. Σύμφωνα με την ίδια έρευνα, τα CS και SCGs αποτελούν σημαντικό παράγοντα μόλυνσης του περιβάλλοντος κατά την απόρριψή τους σε χωματερές, λόγω της παρουσίας ταννινών, πολυφαινολών και καφεΐνης (Mussatto et al., 2011).

Οι Ballesteros et al. (2014) ανέλυσαν τη σύσταση των SCGs και διαπίστωσαν ότι οι πολυσακχαρίτες είναι τα πιο άφθονα συστατικά τους, με τις ημικυτταρίνες να υπερτερούν σε ποσοστό περίπου 51%. Οι ημικυτταρίνες είναι ένα ετεροπολυμερές κλάσμα που αποτελείται από πεντόζες (όπως ξυλόζη και αραβινόζη) και εξόζες (όπως μαννόζη, γαλακτόζη). Επίσης, σημαντικό ποσοστό καταλαμβάνει και η κυτταρίνη, που συνιστά έναν γραμμικό πολυσακχαρίτη αποτελούμενο από μόρια γλυκόζης (Mussatto et al., 2011). Σε ποσοστό σακχάρων, η μαννόζη αποτελεί το 37,03%, η γαλακτόζη το 31,9%, η γλυκόζη το 24,08% και η αραβινόζη το 6,99%, με πιθανές διαφοροποιήσεις να οφείλονται στην ποικιλία του καφέ (Ballesteros et al., 2014). Η λιγνίνη και οι πρωτεΐνες ανέρχονται σε ποσοστό περίπου 20%, με την τέφρα να ανευρίσκεται σε μικρά ποσοστά, περίπου 1% (Ballesteros et al., 2014). Στοιχεία όπως κάλιο, ασβέστιο,

μαγνήσιο, φωσφόρος, θείο, σίδηρος, μαγγάνιο, βόριο και χαλκός υπάρχουν στα SCGs, με τα πρώτα τρία να είναι τα αφθονότερα μέταλλα (Ballesteros et al., 2014). Όσον αφορά στα λιπίδια, στη μελέτη των Ballesteros et al. (2014) βρέθηκαν σε χαμηλό ποσοστό, περίπου 2,2%, ενώ στην έρευνα των Obruca et al. (2014) για την παραγωγή πολυυδροξυαλκανοϊκών εστέρων (PHAs) βρέθηκαν σε ποσοστό 15%. Το ευρύτερο πλαίσιο της σύστασης των SCGs παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Χημική σύσταση των SCGs

Συστατικά	% w/w <sub>dry</sub>	Βιβλιογραφική αναφορά
Κυτταρίνη	6,8-15,3	(Murthy & Naidu, 2012; Mata et al., 2018; Mussatto et al., 2011)
Ημικυτταρίνη	30,0 – 41,7	(Obruca et al., 2015; Murthy & Naidu, 2012)
<i>Αραβινάνη</i>	1,7-3,6	(Ballesteros et al., 2014; Mussatto et al., 2011)
<i>Γαλακτάνη</i>	13,8-18,09	(Ballesteros et al., 2014; Mussatto et al., 2011)
<i>Μαννάνη</i>	18,22-21,2	(Ballesteros et al., 2014; Mussatto et al., 2011)
Πρωτεΐνες	6,7-14,4	(Obruca et al., 2015; Murthy & Naidu, 2012)
Έλαιο	10,0-20,0	(Obruca et al., 2015; Kookos, 2018)
Τέφρα	0,43-2,6	(Mata et al., 2018; Kwon et al., 2013)
Λιγνίνη	22,2-33,6	(Ballesteros et al., 2014; Mata et al., 2018)

### 1.2.1.1. Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας από απόβλητα καφέ

Τα SCGs είναι οργανικό υπόλειμμα το οποίο μπορεί να επεξεργαστεί και να αξιοποιηθεί με διάφορους τρόπους, μειώνοντας τις επιπτώσεις του στο περιβάλλον (Caetano et al., 2014). Η συγκεκριμένη ροή αποβλήτων, εκτός από την απόρριψή της σε χωματερές, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη σε διάφορες διεργασίες. Όπως προαναφέρθηκε, τα SCGs είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά, τα οποία έχουν σημαντική φαρμακευτική αξία, λόγω της αντιοξειδωτικής, αντιγηραντικής, αντικαρκινικής και αντιαλλεργικής δράσης των (Massaya et al., 2019). Σύμφωνα με την έρευνα των López-Barrera et al. (2016), το χλωρογενικό οξύ και το γαλλικό οξύ είναι τα αφθονότερα φαινολικά συστατικά στα SCGs, καταλαμβάνοντας περισσότερο

από το 80% της σύστασης τους. Η παρουσία του χλωρογενικού οξέος αποτελεί ιδιαίζουσα περίπτωση, καθώς η κατανάλωση ροφημάτων πλούσιων σε αυτό προσδίδει σημαντικά οφέλη στον οργανισμό, με κυριότερα την μείωση του κινδύνου για αθηροσκλήρωση, διαβήτη και ανάπτυξης διαφόρων τύπων καρκίνου (Panusa et al., 2013). Τα φαινολικά συστατικά μπορούν να εκχυλιστούν από τα SCGs με χρήση πολικών διαλυτών, όπως αιθανόλη και μεθανόλη αναμιγνυόμενα με απιονισμένο νερό (Kovalcik et al., 2018). Παρ' όλα αυτά, η παρουσία φαινολικών συστατικών δημιουργεί και μειονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα, η καφεΐνη και οι ταννίνες περιορίζουν τη χρήση των SCGs ως ζωοτροφές λόγω των μη θεραπευτικών ιδιοτήτων τους, ενώ το χλωρογενικό οξύ είναι φυτοτοξικό, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η χρήση των SCGs ως φυτικό λίπασμα (Janissen & Huynh, 2018). Τα SCGs περιέχουν επίσης σημαντική ποσότητα πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, λόγω της μεγάλης και συνεχούς προσφοράς και του σχετικά χαμηλού κόστους, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα για την ανθρώπινη διατροφή (Mussatto et al., 2011). Επιπρόσθετα, η ταυτόχρονη παρουσία πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών και μετάλλων, δίνουν τη δυνατότητα στα SCGs να λειτουργήσουν ως ιδανικά υποστρώματα για μικροβιακές ζυμώσεις και για παραγωγή ενώσεων που βρίσκουν εφαρμογή στις βιομηχανίες φαρμάκων και τροφίμων (Mussatto et al., 2011).

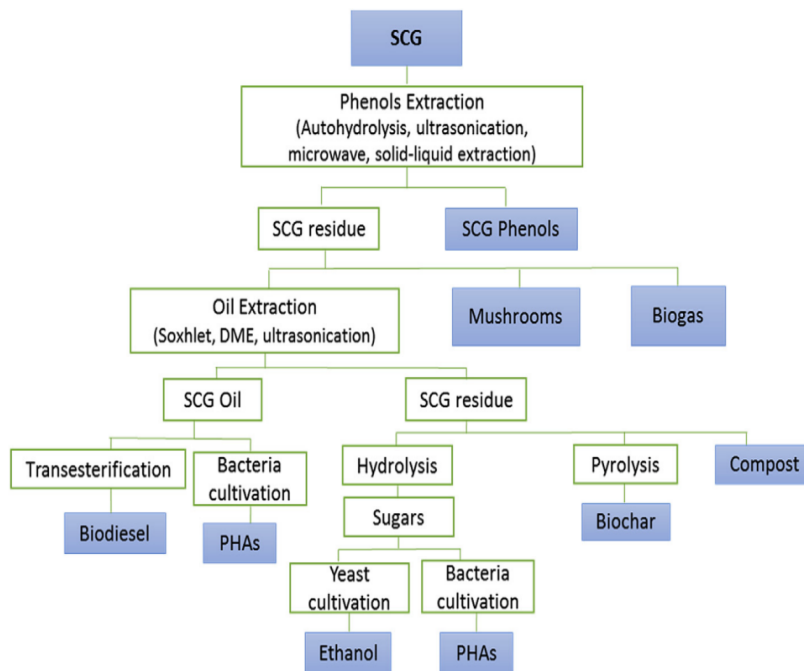
Ένα προϊόν προστιθέμενης αξίας από SCGs που έχει μελετηθεί διεξοδικά, είναι το βιοντίζελ (Efthymiopoulos et al., 2018). Το βιοντίζελ είναι ένα βιοκαύσιμο που παράγεται από ανανεώσιμες πηγές, έχει περιορισμένες εκπομπές μονοξειδίου του άνθρακα, σωματιδίων και διοξειδίου του θείου, είναι βιοδιασπώμενο, μη τοξικό και σχετικά ασφαλές στον χειρισμό (Apostolakou et al., 2009). Για την χρησιμοποίησή του σε κινητήρες, είναι απαραίτητο να ελέγχονται ορισμένες κρίσιμες παράμετροι. Όπως περιγράφουν οι Bharathiraja et al. (2017), απαιτείται ο έλεγχος για τον αριθμό κετανίου, το σημείο ανάφλεξης, το σημείο νέφους (cloud point), το σημείο ροής (pour point), την οξειδωτική σταθερότητα και το κινηματικό ιξώδες. Στη μελέτη των Uddin et al. (2019), παρήχθη βιοντίζελ από το έλαιο των SCGs όπου κυριαρχούσαν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα σε ποσοστό περίπου 62%, με το λινελαϊκό να συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ποσοστό της τάξης του 28,71%. Στην μελέτη του Kookos (2018), πραγματοποιήθηκε μια τεχνοοικονομική και περιβαλλοντική αξιολόγηση της διαδικασίας παραγωγής βιοντίζελ από SCGs. Εκτιμάται ότι 0,65 kg αποξηραμένων αποβλήτων καφέ (dried spent coffee grounds, DSCGs) παράγονται από 1 kg πράσινων

κόκκων καφέ που υπόκεινται σε «ψήσιμο» (roasting) το οποίο απομακρύνει την υγρασία και τα μετατρέπει σε καφέ κόκκους. Τα DSCGs περιέχουν περίπου 50% κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, 10 - 15% λιπίδια, 0,1 – 0,8 % χλωρογενικό οξύ και 32% φαινολικά συστατικά. Η σύσταση των λιπιδίων διαφοροποιείται ανάλογα με την προέλευση των πράσινων κόκκων καφέ και αποτελούνται κυρίως από λινελαϊκό, παλμιτικό, στεατικό, ελαϊκό και λινολενικό οξύ (Campos – Vega et. al., 2015). Στη μελέτη του Kookos (2018), περιγράφεται αναλυτικά η διεργασία παραγωγής βιοντίτζελ από απόβλητα καφέ. Πιο συγκεκριμένα, από 2917 kg/h απόβλητα καφέ απομακρύνεται η υγρασία (65%, ήτοι 1896 kg/h) και προκύπτουν 1021 kg/h DSCGs. Το αποξηραμένο απόβλητο αναμιγνύεται με εξάνιο, το οποίο λειτουργεί ως εξαιρετικός διαλύτης λόγω χαμηλής θερμότητας εξάτμισης, και προκύπτει ρεύμα που αποτελείται από ελεύθερα λίπους απόβλητα καφέ (defatted spent coffee grounds, DFSCGs). Στη συνέχεια, το ρεύμα εισέρχεται σε φυγοκεντρικό διαχωριστή (nozzle centrifugal separator), η στερεή φάση διαχωρίζεται από την υγρή, με την τελευταία να οδηγείται σε εξατμιστήρα όπου απομακρύνεται ο διαλύτης και παραλαμβάνεται το έλαιο. Κατόπιν, το παραχθέν έλαιο υπόκειται σε μετεστεροποίηση με μεθανόλη και NaOH, όπου προκύπτουν μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (βιοντίτζελ) και γλυκερόλη με ποσοστό μετατροπής 90%. Το μίγμα αυτό οδηγείται σε διαχωριστή όπου απομακρύνεται η γλυκερόλη και το έλαιο που δεν μετατράπηκε σε βιοντίτζελ. Η ροή που περιέχει το βιοντίτζελ αναμιγνύεται με νερό και HCl για να εξουδετερωθεί ο καταλύτης και να μετατραπούν οι σάπωνες σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Τέλος, το μίγμα αυτό φυγοκεντρείται και παραλαμβάνεται το βιοντίτζελ με ελάχιστες ποσότητες νερού, όπου μέσω απόσταξης λαμβάνεται το υψηλής καθαρότητας τελικό προϊόν. Η απόδοση υπολογίζεται περίπου ως 1 g βιοντίτζελ ανά g DSCGs oil. Σε αντίστοιχη μελέτη των Kondamudi et al. (2008) που χρησιμοποιήθηκαν SCGs για την παραγωγή βιοντίτζελ, η παραλαβή και μετεστεροποίηση πραγματοποιήθηκαν με την ίδια διεργασία και με KOH ως καταλύτη και τα λιπαρά οξέα που ταυτοποιήθηκαν ήταν το παλμιτικό οξύ (51,4%), το λινελαϊκό οξύ (40,3%) και το στεατικό οξύ (8,3%). Κατά τη μετατροπή του ελαίου των SCGs σε βιοντίτζελ, σημαντικοί παράγοντες είναι η σύσταση και ο τύπος των λιπαρών οξέων του ελαίου. Πιο συγκεκριμένα, τα υψηλά επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο έλαιο των SCGs, επηρεάζουν τη διαδικασία της μετεστεροποίησης γιατί σχηματίζονται σάπωνες σαν παραπροϊόντα, κατά την αλκαλικά καταλυόμενη μετεστεροποίηση (Kovalcik et al., 2018).

Ένα προϊόν προστιθέμενης αξίας που μπορεί επίσης να παραχθεί με χρήση των SCGs είναι το γαλακτικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Hudeckova et al. (2018), το υδρόλυμα των SCGs ήταν η πρώτη ύλη για την παραγωγή γαλακτικού οξέος, τόσο σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες, όσο και σε ημι-συνεχείς σε βιοαντιδραστήρα. Μεταξύ των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν, η μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος (10,75 g/L) έγινε με τον *Lactobacillus rhamnosus* σε ασυνεχή καλλιέργεια. Αξιοσημείωτη είναι και η παραγωγή βιοπολυμέρων από SCGs, όπως στην έρευνα των Obruca et al. (2014), όπου το έλαιο που εκχυλίστηκε από τα SCGs χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα σε ζύμωση με το βακτήριο *Cupriavidus necator* H16 για παραγωγή πολυ(3-υδροξυβουτυρικού) εστέρα (PHB). Ως προς την απευθείας παραγωγή βιοαιθανόλης από SCGs χωρίς την εκχύλιση του ελαίου, το πρόβλημα εντοπίζεται στην παρουσία τριγλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων που προκαλεί μείωση της δράσης των ενζύμων που συμβάλλουν στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών προς απλούστερα σάκχαρα (Kwon et al., 2013). Τέλος, το βιοαέριο είναι ένα ακόμα προϊόν προστιθέμενης αξίας που μπορεί να παραχθεί από SCGs μέσω αναερόβιας χώνευσης (Giroto et al., 2018).

Συνοπτικά, σύμφωνα με τους Kourmentza et al. (2018), τα SCGs λόγω υψηλής περιεκτικότητας σε οργανικά υλικά υπό τη μορφή πολυσακχαριτών, λιπαρών οξέων, αμινοξέων, πολυφαινολών και μετάλλων, μπορούν να οδηγήσουν σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας κατόπιν βιοεπεξεργασίας, όπως φαίνεται συνοπτικά και στην Εικόνα 3.





**Εικόνα 3:** Μονοπάτια παραγωγής προϊόντων από SCGs (Kourmentza et al., 2018)

### 1.3 Λιπίδια

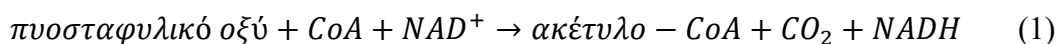
Στην οργανική χημεία, οι ενώσεις ταξινομούνται ανάλογα με τις λειτουργικές τους ομάδες. Ωστόσο, τα λιπίδια ταξινομούνται με βάση τη διαλυτότητά τους. Πρόκειται για ενώσεις που μπορούν να εκχυλιστούν από κύτταρα και ιστούς με τη χρήση μη πολικών διαλυτών. Μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κατηγορίες, τα σύνθετα και τα απλά. Τα τελευταία είναι αυτά που δεν υδρολύονται εύκολα με υδατικό οξύ ή βάση, ενώ τα τελευταία είναι αυτά που υδρολύονται εύκολα προς απλούστερα συστατικά. Η πλειονότητα των λιπιδίων αυτής της κατηγορίας είναι εστέρες καρβοξυλικών οξέων μακράς αλυσίδας (λιπαρά οξέα), με τις τρεις κυριότερες ομάδες αυτών των εστέρων να είναι τα γλυκερίδια (εστέρες της γλυκερόλης), οι κηροί (εστέρες αλκοολών μακράς αλυσίδας) και τα φωσφολιπίδια (Wade, 2013).

### 1.3.1 Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και βιοτεχνολογικές εφαρμογές τους

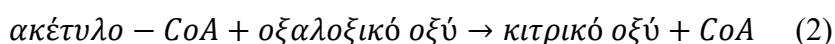
Υπάρχουν ορισμένοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν διαμορφώνονται οι κατάλληλες συνθήκες μπορούν να συνθέτουν και να συσσωρεύουν μικροβιακά λιπίδια (Single cell oil, SCO) σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% του βάρους τους. Αυτοί οι μικροοργανισμοί ονομάζονται «ελαιογόνοι» (oleaginous species), μπορεί να είναι μύκητες, βακτήρια, ζύμες ή άλγη, συνήθως μη παθογόνοι και τα λιπίδια που συσσωρεύουν έχουν παρόμοια σύσταση με αυτά των φυτικών ελαίων (Ratledge, 1994; Beopoulos et al., 2011). Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, στερούνται ενδοτοξινών, μπορούν να υποστούν γενετική τροποποίηση και είναι κατάλληλοι να χρησιμοποιούνται σε ζυμώσεις μεγάλης κλίμακας, με αποτέλεσμα να ενδείκνυνται για χρήση με σκοπό την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως το βιοντίζελ (Beopoulos et al., 2011). Από τα είδη ζυμών που υπάρχουν, περίπου 25 είναι ελαιογόνα (Ratledge, 1994) και ανήκουν στα γένη *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Trichosporon*, *Lipomyces* και *Yarrowia* και είναι ικανά να συσσωρεύουν λιπίδια σε ποσοστό 40% (Ratledge & Tan, 1990). Το ποσοστό αυτό διαφέρει ανάλογα με το γενετικό προφίλ κάθε μικροοργανισμού, μιας και η μέγιστη εφικτή περιεκτικότητα σε λιπίδια μπορεί να είναι διαφορετική μεταξύ των ειδών ακόμα και μεταξύ των στελεχών ενός είδους (Athenaki et al., 2017). Ως προς τη σύσταση των λιπιδίων, οι τριακυλογλυκερόλες (TAGs) κυριαρχούν σε μεγάλο ποσοστό, περίπου 80-90%, με τους στερυλεστέρες (SE) να συμπληρώνουν το υπόλοιπο ποσοστό. Αυτά τα ουδέτερα λιπίδια συσσωρεύονται σε εξειδικευμένα «διαμερίσματα» του κυττάρου που ονομάζονται λιποσώματα. Τα λιποσώματα περιβάλλονται από μια στιβάδα φωσφολιπιδίων στην οποία ενσωματώνονται πολλές πρωτεΐνες με διαφορετικές λειτουργίες (Beopoulos et al., 2011; Zweytick et al., 2000; Brown, 2001; Fujimoto et al., 2008).

Για την συσσώρευση μικροβιακών λιπιδίων στο κύτταρο, είναι απαραίτητη η εξάντληση ενός θρεπτικού συστατικού του υποστρώματος, συνήθως του αζώτου, ενώ ταυτόχρονα το θρεπτικό μέσο πρέπει να είναι πλούσιο σε άνθρακα, ώστε να διατηρείται υψηλός λόγος C/N (Jin et al., 2015; Ageitos et al., 2011). Ο μικροοργανισμός καταναλώνει αρχικά όλα τα θρεπτικά συστατικά στο μέσο της ζύμωσης, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται μια ισορροπημένη αύξηση. Με την εξάντληση της πηγής αζώτου, αρχίζει η «λιπογενετική» αύξηση όπου η πηγή άνθρακα εξακολουθεί να καταναλώνεται

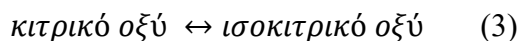
από τον μικροοργανισμό και η ροή του κατευθύνεται προς τη λιποσυσσώρευση. Όταν εξαντληθεί η πηγή άνθρακα, ο μικροοργανισμός αρχίζει να καταναλώνει τα λιπίδια τα οποία έχει συσσωρεύσει. Συνεπώς, γίνεται κατανοητό ότι τα μικροβιακά λιπίδια συντίθενται σε συνθήκες πενίας κάποιου θρεπτικού συστατικού σε συνδυασμό με την παρουσία πηγής άνθρακα και καταναλώνονται ελλείψει αυτής (Ratledge, 1994). Η πηγή άνθρακα μπορεί να ποικίλει, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες ενώσεις, με την πρώτη περίπτωση να οδηγεί στην *de novo* βιοσύνθεση λιπιδίων και τη δεύτερη στην *ex novo*. Στη *de novo* βιοσύνθεση, τα σάκχαρα καταναλώνονται μέσω του μονοπατιού της γλυκόλυσης (Emden Meyerhof Parnas, EMP), η οποία πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα, και προκύπτει πυροσταφυλικό οξύ, με ενεργειακό όφελος 2 μόρια ATP, καθώς και 2 μόρια NADH που προκύπτουν στη μοναδική οξειδοαναγωγική αντίδραση του μονοπατιού. Κατόπιν, το πυροσταφυλικό οξύ εισέρχεται στο μιτοχόνδριο, δίδοντας ακέτυλο-CoA μέσω της δράσης του ενζύμου πυροσταφυλική αφυδρογονάση (Papanikolaou & Aggelis, 2011a; Ratledge, 1994), σύμφωνα με την κάτωθι αντίδραση:



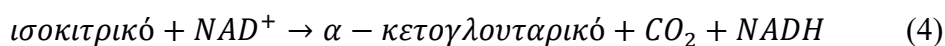
Το ακέτυλο-CoA εισέρχεται στον κύκλο του Krebs μέσω της αντίδρασης συμπύκνωσης με το οξαλοξικό οξύ, που καταλύεται από την κιτρική συνθάση (Ratledge, 1994):



Το κιτρικό οξύ μετατρέπεται αυθόρμητα σε ισοκιτρικό οξύ με δράση της ακοτινάσης:

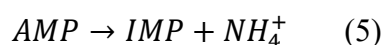


Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει τη μετατροπή του ισοκιτρικού σε α-κετογλουταρικό, με τη δράση του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (Ratledge, 1994), σύμφωνα με την αντίδραση:

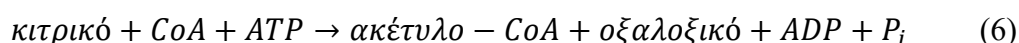


Το σημείο κλειδί στη *de novo* βιοσύνθεση λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι η ανωτέρω αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα, όταν ο μικροοργανισμός εξαντλήσει όλο το άζωτο του θρεπτικού μέσου, ενεργοποιείται το

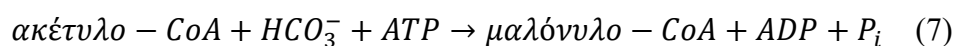
ένζυμο απαμινάση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης που μετατρέπει την μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) σε μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP) απελευθερώνοντας άζωτο (Beoroulos et al., 2011) σύμφωνα με την αντίδραση:



Η AMP ενεργοποιεί αλλοστερικά την ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH) που βρίσκεται στο μιτοχόνδριο, συνεπώς με τη μετατροπή της σε IMP και τη μείωση της συγκέντρωσής της, μειώνεται η δράση της ICDH και άρα ο κύκλος του Krebs διακόπτεται, καθώς δεν είναι εφικτή η πραγματοποίηση της αντίδρασης (4). Επιπλέον, το ισοκιτρικό συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο και λόγω της αμφίδρομης αντίδρασης (3) παρατηρείται συσσώρευση κιτρικού (Ratledge, 1994). Το κιτρικό οξύ απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, όπου με τη δράση του ενζύμου ATP-κιτρική λυάση (ACL), που απαντάται στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς και απουσιάζει στους μη, μετατρέπεται σε ακέτυλο-CoA και οξαλοξικό (Ratledge, 1994), σύμφωνα με την αντίδραση (6):

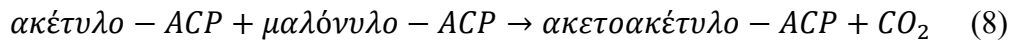


Κατόπιν, ακολουθεί το πρώτο βήμα της βιοσύνθεσης λιπιδίων. Το ακέτυλο-CoA που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, με τη δράση του ενζύμου καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA (acetyl-CoA carboxylase, ACC), μετατρέπεται σε μαλόνυλο-CoA, που είναι το πρόδρομο μόριο για την επιμήκυνση των λιπαρών οξέων (Tai & Stephanopoulos, 2013), σύμφωνα με την αντίδραση:

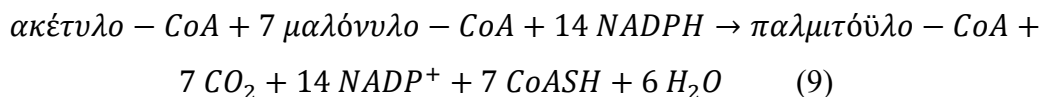


Η αντίδραση (7) είναι καθοριστική για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και ενεργοποιείται με τη συσσώρευση κιτρικού. Στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς, όπου η ACL δεν απαντάται, το ένζυμο ACC που καταλύει την αντίδραση (7) υφίσταται ως ανενεργή πρωτεΐνη (Paranikolaou & Aggelis, 2011a).

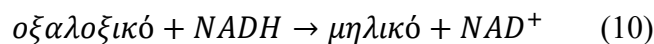
Με το σχηματισμό του μαλόνυλο-CoA, η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων πραγματοποιείται με τη βοήθεια του συμπλέγματος ενζύμων «συνθετάση λιπαρών οξέων» (Fatty acid synthetase, FAS) (Paranikolaou & Aggelis, 2011a). Αρχικά, τα ακέτυλο-CoA και μαλόνυλο-CoA μεταφέρονται σε μια ακυλοφόρο πρωτεΐνη (acyl-carrier protein, ACP) για να παραχθούν ακέτυλο-ACP και μαλόνυλο-ACP (Athenaki et al., 2017), τα οποία συμπυκνώνονται προς παραγωγή ακετοακέτυλο-ACP:



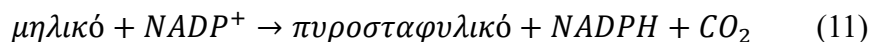
Το ακετοακέτυλο-ACP ανάγεται σε D-3-υδροξυβουτύρυλο-ACP με τη δράση ενός μορίου NADPH και κατόπιν αφυδατώνεται προς κροτόνυλο-ACP, με τον κύκλο να κλείνει με την αναγωγή του τελευταίου προς βουτύρυλο-ACP, επίσης με δράση ενός μορίου NADPH. Ο κύκλος επαναλαμβάνεται έως ότου σχηματιστεί το παλμιτόϋλο-CoA, με 16 άτομα άνθρακα. Από το ακέτυλο-CoA, που έχει 2 άτομα άνθρακα, παρήχθη βουτύρυλο-ACP, που έχει 4 άτομα, με τον κάθε κύκλο να προσθέτει 2 άτομα άνθρακα, να απελευθερώνει 2 μόρια CO<sub>2</sub> (αντίδραση 8) και να καταναλώνει 2 μόρια NADPH. Συνεπώς, για το σχηματισμό του παλμιτόϋλο-CoA απαιτούνται 7 κύκλοι, που αντίστοιχα θα απελευθερώσουν 7 μόρια CO<sub>2</sub> και θα καταναλωθούν 14 μόρια NADPH, με την αντίδραση σχηματισμού του παλμιτόϋλο-CoA να είναι η κάτωθι (Paranikolaou & Aggelis, 2011a):



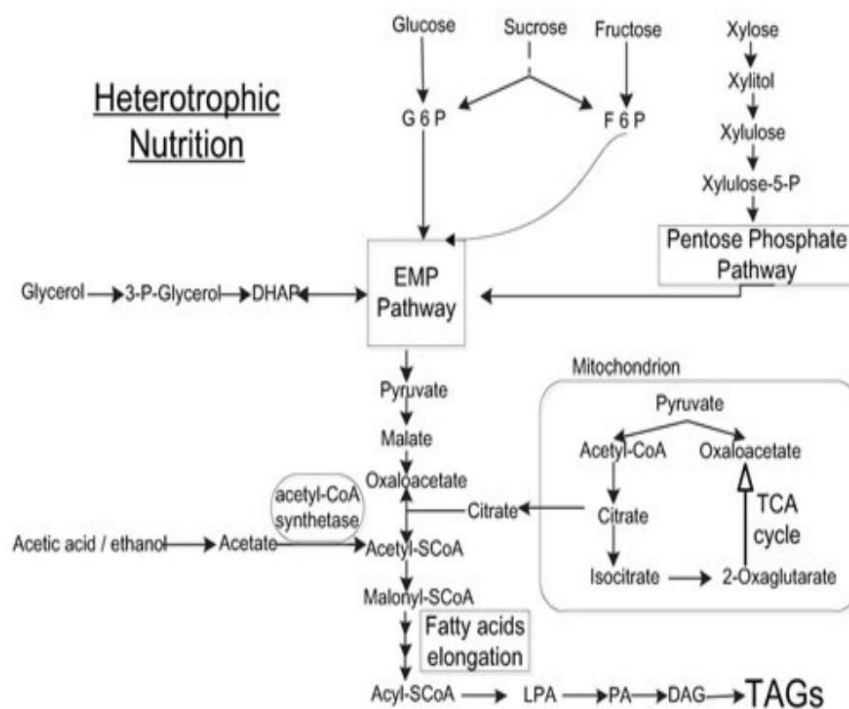
Γίνεται κατανοητό πως απαιτείται ποσότητα αναγωγικής ισχύος υπό τη μορφή του NADPH για να πραγματοποιηθεί η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Η αναγωγική ισχύς προέρχεται είτε από την οδό φωσφορικών πεντοζών είτε από μια σειρά αντιδράσεων όπου καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει το μηλικό ένζυμο (malic enzyme, ME) (Ratledge, 1994). Σύμφωνα με την εξίσωση (6), με δράση της ACL το κιτρικό δίδει ακέτυλο-CoA και οξαλοξικό στο κυτταρόπλασμα. Με τη δράση του ενζύμου μηλική αφυδρογονάση (Malate dehydrogenase, MDH), το οξαλοξικό ανάγεται σε μηλικό:



Κατόπιν, το μηλικό αποκαρβοξυλιώνεται σε πυροσταφυλικό με τη δράση του ME, δίδοντας NADPH και CO<sub>2</sub>:



Στην Εικόνα 4 συνοψίζεται το βιοχημικό μονοπάτι για την παραγωγή TAGs από ελαιογόνους μικροοργανισμούς.



**Εικόνα 4:** Μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής τριγλυκεριδίων (TAGs) στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Xu et al., 2013)

Μόλις συντεθούν το παλμιτικό (C16:0) και το στεατικό οξύ (C18:0), πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο η προσθήκη διπλών δεσμών από τις αποκορεσμάσες (desaturases) και η επιμήκυνση της αλυσίδας από ένζυμα που επιτελούν αυτή τη λειτουργία (elongases). Υπάρχουν τρία είδη αποκορεσμάσων: οι άκυλο-CoA αποκορεσμάσες, οι άκυλο-ACP αποκορεσμάσες και οι ακυλο-λιπιδικές αποκορεσμάσες (acyl-lipid desaturases). Ο πρώτος διπλός δεσμός εισάγεται στη θέση  $\Delta^9$  και προκύπτει το παλμιτελαϊκό (C16:1) και το ελαϊκό (C18:1) οξύ. Γενικά, το στεάρυλο-CoA ή το στεάρυλο-ACP είναι το υπόστρωμα για την εισαγωγή του πρώτου διπλού δεσμού από την  $\Delta^9$  αποκορεσμάση. Κατόπιν, στο ελαϊκό οξύ δρα η  $\Delta^{12}$  αποκορεσμάση προς σχηματισμό λινελαϊκού οξέος ( $\Delta^{9,12}$ C18:2). Τέλος, μέσω του τελευταίου και με την περαιτέρω δράση της  $\Delta^{15}$  αποκορεσμάσης σχηματίζεται το αλινολενικό οξύ ( $\Delta^{9,12,15}$ C18:3). Το επόμενο βήμα για την επιμήκυνση των λιπαρών οξέων είναι η δράση των  $\Delta^4, \Delta^5, \Delta^6$  αποκορεσμάσων σε συγκεκριμένα πρόδρομα λιπαρά οξέα και κατόπιν η επιμήκυνση, προς σχηματισμό C<sub>20</sub> και C<sub>22</sub> πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως το αραχιδονικό οξύ (C20:4), το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (C20:5) και το εικοσιδιεξανοϊκό οξύ (C22:6), που έχουν σπουδαία διατροφική και φαρμακευτική δράση (Bellou et al., 2016; Certik & Shimizu, 1999).

Κατά τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, όπως φαίνεται στην αντίδραση (9), σχηματίζονται λιπαροί-CoA εστέρες (fatty-CoA ester). Όπως αναφέρθηκε, οι TAGs κυριαρχούν στα μικροβιακά λιπίδια σε μεγάλο ποσοστό, με τη σύνθεσή τους να γίνεται μέσω του μονοπατιού της ακυλίωσης της α-P-γλυκερόλης (α-glycerol phosphate acylation). Αρχικά, πραγματοποιείται ακυλίωση της 3-P-γλυκερόλης στην sn-1 θέση και παράγεται λυσοφωσφατιδικό το οποίο κατόπιν ακυλιώνεται στην sn-2 θέση προς φωσφατιδικό οξύ. Το φωσφατιδικό οξύ αποφωσφορυλιώνεται και προκύπτει διακυλογλυκερόλη (DAG), όπου μέσω ακυλίωσης από την ακυλοτρανσφεράση της διακυλογλυκερόλης προκύπτει TAG, με ακόρεστο λιπαρό οξύ στη θέση sn-2 (Papanikolaou & Aggelis, 2011a).

Η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων είναι σημαντική στον τομέα της βιοτεχνολογίας, με τις μελέτες να αυξάνονται όλο και περισσότερο για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής τους. Τα μικροβιακά λιπίδια οφείλουν να ανταποκρίνονται σε δυο σημαντικούς κλάδους, αυτόν για τη χρήση τους στην παραγωγή βιοκαυσίμων και αυτόν της παραγωγής ελαίου για ανθρώπινη κατανάλωση (Ratledge, 2013). Σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί η δυνατότητά τους να παράγονται όλο τον χρόνο με ρυθμούς παραγωγής μεγαλύτερους από αυτούς των φυτικών ελαίων (Bharathiraja et al., 2017). Το πρώτο μικροβιακό έλαιο παρήχθη με τη χρήση του μικροοργανισμού *Mucor circinelloides* μεταξύ 1985-1990 και ήταν πλούσιο σε γ-λινολενικό οξύ (GLA, Δ6,9,12C18:3) (Ratledge, 2013).

Σημαντική είναι η συνεισφορά των μικροβιακών λιπιδίων στον τομέα των βιοκαυσίμων. Η αυξανόμενη ζήτηση 1ης γενιάς βιοντίζελ που προέρχεται από μετεστεροποίηση φυτικών ελαίων, έχει αυξήσει τις τιμές διαφόρων τροφίμων με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η χρήση διαφορετικών πρώτων υλών. Συμπερασματικά, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί που καλλιεργούνται σε αγροτοβιομηχανικά απόβλητα είναι ικανοί να παράγουν λιπίδια τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή 2ης γενιάς βιοντίζελ (Papanikolaou & Aggelis, 2011b).

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) έχουν ευεργετικές ιδιότητες για τη λειτουργία της καρδιάς και την πρόληψη ασθενειών, ενώ μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (Bharathiraja et al., 2017). Το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA), είναι ένα πολυακόρεστο οξύ με σημαντικές ιδιότητες στην αντιμετώπιση της αύξησης της αρτηριακής πίεσης και σε διάφορες φλεγμονώδεις αντιδράσεις και δύναται να παραχθεί με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών (Ratledge, 2013).

## 2. Σκοπός μελέτης

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με τη χρήση της ελαιογόνου ζύμης *C. curvatus* ATCC 20509, σε διαφορετικές πηγές αζώτου αξιοποιώντας το υδρόλυμα αποβλήτου καφέ.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες σε διαφορετικές πηγές αζώτου και με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, με σκοπό την αξιολόγηση της ικανότητας του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται και να συνθέτει λιπίδια στις διαφορετικές αυτές πηγές. Εν συνέχεια, έλαβαν χώρα ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες με τις πηγές αζώτου που απέδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Σε αυτή την περίπτωση, ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε μίγμα εμπορικών σακχάρων που προσομοίωναν το υδρόλυμα καφέ καθώς και μίγμα που προέκυψε από την ενζυμική υδρόλυση του προς εξέταση αποβλήτου. Σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε ανάλυση των λιπαρών υλών για την αξιολόγηση της σύστασης των μικροβιακών λιπιδίων. Τέλος, ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 μελετήθηκε σε ημισυνεχή ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία με σκοπό την αύξηση παραγωγής βιομάζας και μικροβιακών λιπιδίων.



### **3. Υλικά και μέθοδοι**

#### **3.1 Μικροοργανισμός**

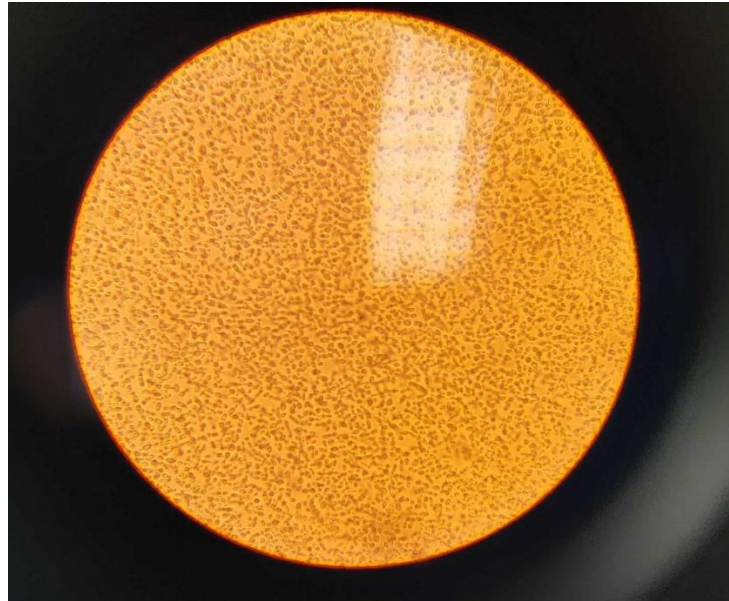
Για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε η ζύμη *C. curvatus* ATCC 20509 (American Type Culture Collection – ATCC, Manassas, Virginia, USA). Ο μικροοργανισμός φυλασσόταν σε φιαλίδια (cryovials) με διάλυμα γλυκερόλης (50% v/v) υπό συνθήκες κατάψυξης στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2 Προκαλλιέργειες**

Κατά το πρώτο στάδιο των μικροβιακών ζυμώσεων είναι απαραίτητη η παρασκευή προκαλλιεργιών με σκοπό την προσαρμογή του μικροοργανισμού, τον έλεγχο της καταλληλότητάς του καθώς και τον πολλαπλασιασμό του ώστε να εμβολιαστεί με ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων. Οι προκαλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 500 mL (Erlenmeyer baffled flasks) με ενεργό όγκο 100 mL και σύσταση 10 g/L γλυκόζη, 10 g/L πεπτόνη και 10 g/L εκχύλισμα ζύμης. Τα συστατικά ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο ( $121^{\circ}\text{C}$ , 20 λεπτά), με την πηγή άνθρακα να αποστειρώνεται ξεχωριστά από τις πηγές αζώτου. Με το πέρας της αποστείρωσης, η απαραίτητη ποσότητα γλυκόζης αναμίχθηκε με την πηγή αζώτου σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Laminar). Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε από φιαλίδιο (Cryovial) και οι κωνικές φιάλες οδηγήθηκαν σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης (Shaker, New Brunswick Sc, USA) σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και ανάδευσης ( $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  και  $200 \pm 5$  rpm αντίστοιχα) για 24 ώρες.

#### **3.3 Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε τρυβλία Petri**

Ο εμβολιασμός του θρεπτικού μέσου κάθε ζύμωσης έλαβε χώρα από υγρή προκαλλιέργεια η οποία είχε εμβολιασθεί με αποικίες του μικροοργανισμού από στερεή (τρυβλία Petri). Το θρεπτικό μέσο της στερεής καλλιέργειας αποτελείτο από 10 g/L γλυκόζη, 10 g/L πεπτόνη, 10 g/L εκχύλισμα ζύμης και 20 g/L άγαρ. Τα συγκεκριμένα υλικά αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο και κατόπιν μεταφέρθηκαν περίπου 15 mL άγαρ σε κάθε τρυβλίο υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν από υγρή προκαλλιέργεια (εδάφιο 3.2) με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου στο τέλος της εκθετικής αύξησης και επώασθηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας  $30^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 72 ώρες.



**Εικόνα 5.** Παρατήρηση προκαλλιέργειας στο μικροσκόπιο μετά από 24h

### **3.4 Παρασκευή θρεπτικού μέσου για την παραγωγή SCOs σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες**

Ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 μελετήθηκε σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες για την παραγωγή λιπιδίων σε διαφορετικές πηγές αζώτου και με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. Οι πηγές αζώτου που εξετάστηκαν ήταν η ουρία ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), το corn steep liquor (CSL), η πεπτόνη, το εκχύλισμα ζύμης, το θειικό αμμώνιο ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), το χλωριούχο αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), το νιτρικό κάλιο ( $\text{KNO}_3$ ) και το νιτρώδες νάτριο ( $\text{NaNO}_2$ ). Η αρχική συγκέντρωση του σακχάρου ήταν 100 g/L, της ουρίας 1,22 g/L, του CSL 7,14 g/L, της πεπτόνης 3,69 g/L, του εκχυλίσματος ζύμης 5,19 g/L, του θειικού αμμωνίου 2,69 g/L, του χλωριούχου αμμωνίου 2,18 g/L, του νιτρικού καλίου 4,12 g/L και του νιτρώδους νατρίου 2,81 g/L. Οι συγκεντρώσεις αυτές υπολογίστηκαν με βάση το μοριακό βάρος του αζώτου σε κάθε πηγή με σκοπό να επιτευχθεί ο επιθυμητός λόγος C/N = 70 στην έναρξη των ζυμώσεων.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με πηγή άνθρακα εμπορικά σάκχαρα κατ' αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ, με πηγές αζώτου την ουρία, το CSL και το θειικό αμμώνιο. Τέλος, μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής λιπιδίων σε ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα το υδρόλυμα αποβλήτου καφέ αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 100 g/L και πηγή αζώτου την ουρία, το CSL και το θειικό αμμώνιο, με τις ίδιες συγκεντρώσεις που αναγράφονται ανωτέρω. Για τις ανάγκες

ανάπτυξης του μικροοργανισμού, στο θρεπτικό μέσο όλων των ζυμώσεων προστέθηκε μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2:** Σύσταση μίγματος αλάτων και ιχνοστοιχείων του υποστρώματος

Σύσταση μίγματος	
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> · 7H <sub>2</sub> O (g/L)	0,02
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (g/L)	0,015

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες 500 mL και με ενεργό όγκο 100 mL. Η ποσότητα του εμβολίου σε όλες τις ζυμώσεις ήταν 10% v/v. Τα θρεπτικά συστατικά αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 20 λεπτά, με τα σάκχαρα να αποστειρώνονται ξεχωριστά από την πηγή αζώτου για αποφυγή της αντίδρασης Maillard. Το pH κατά τη διάρκεια όλων των ζυμώσεων ρυθμίστηκε στο 6 με προσθήκη NaOH συγκέντρωσης 10M. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης, σε θερμοκρασία 30±1 °C και ανάδευση 200±5 rpm.

#### **3.4.1 Παρασκευή υδρολύματος αποβλήτου καφέ**

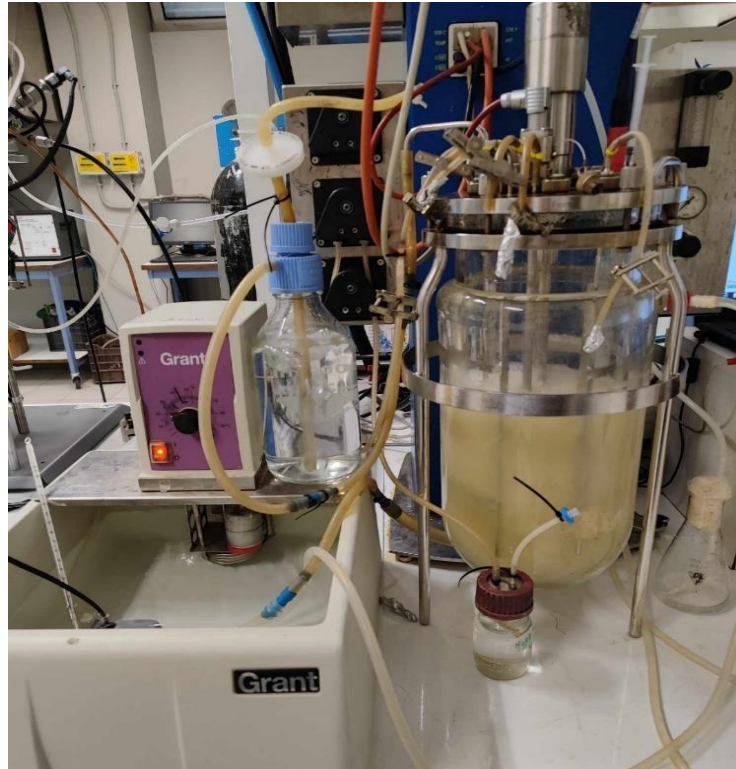
Στις καλλιέργειες του δεύτερου σταδίου της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκαν τα σάκχαρα του υδρολύματος αποβλήτου καφέ ως πηγή άνθρακα. Η παραλαβή του υδρολύματος πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Duran με όγκο 1000 mL, στις οποίες τοποθετήθηκαν 100g SCGs, από τα οποία είχαν αφαιρεθεί το έλαιο και τα φαινολικά συστατικά σύμφωνα με τους Giannakis et al. (2023). Μετά την προσθήκη του στερεού έγινε πλήρωση με απιονισμένο νερό μέχρι τα 1000 mL, αποστείρωση σε αυτόκαυστο για 1 ώρα στους 121 °C και προσθήκη 20 mL ενζύμου (200 μL/g στερεού) σε δύο δόσεις με διαφορά 24 ωρών. Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε

θερμαινόμενο stirrer (50 °C) για 72 ώρες και καθ' όλη τη διάρκειά της το pH ρυθμιζόταν στο 5. Τέλος, το περιεχόμενο φυγοκεντρήθηκε, τα στερεά απορρίφθηκαν και το υπερκείμενο αποστειρώθηκε με φιλτράρισμα (0,22 μm PolyCap™ AS, Whatman Ltd) με σκοπό τη χρήση του ως υπόστρωμα στις καλλιέργειες.

Για την ανωτέρω υδρόλυση, χρησιμοποιήθηκε μίγμα εμπορικών ενζύμων, αποτελούμενο από καρβοξυμεθυλκυτταρινάση (CMCase) (70 U/mL ενζύμου), β-γλυκοσιδάση (80 U/mL ενζύμου), μαλτάση (130 U/mL ενζύμου) και ξυλανάση (55 U/mL ενζύμου).

### **3.5 Παρασκευή θρεπτικού μέσου για την παραγωγή SCOs σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα**

Για την πραγματοποίηση ημι-συνεχούς ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα, επιλέχθηκε η ουρία ως πηγή αζώτου. Πιο συγκεκριμένα, ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 6,7 L (Bioengineering, RALF Advanced) με ενεργό όγκο 3 L (Εικόνα 6). Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε μίγμα εμπορικών σακχάρων σε ποσότητες ανάλογες του υδρολύματος αποβλήτου καφέ και αρχικής συγκέντρωσης 100 g/L. Η συγκέντρωση της ουρίας ήταν 1,22 g/L ώστε να επιτευχθεί λόγος C/N = 70, ενώ και σε αυτή την περίπτωση προστέθηκε μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων (10% v/v) και εμβόλιο (10% v/v) από υγρές προκαλλιέργειες. Καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 30 °C και το pH ρυθμιζόταν αυτόματα στο 6. Η ανάδευση ρυθμίστηκε στα 650 rpm με σταθερή παροχή αέρα στο 1 vvm. Κατά τη μείωση της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων στα 20 g/L έγινε προσθήκη πυκνού διαλύματος (~900 g/L) που προσομοίαζε τα σάκχαρα του υπό εξέταση υδρολύματος.



**Εικόνα 6.** Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα Bioengineering, RALF Advanced 6,7 L

## **Αναλυτικές μέθοδοι**

### **3.5.1 Ποσοτικός προσδιορισμός βιομάζας**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της βιομάζας βασίζεται στη μέτρηση του ξηρού βάρους των κυττάρων (DCW). Πιο συγκεκριμένα 2 mL δείγματος προστίθενται σε προζυγισμένα φιαλίδια erpendorf και φυγοκεντρούνται (11000 rpm, 10 λεπτά, 4 °C) με σκοπό το διαχωρισμό της βιομάζας. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα erpendorf για περαιτέρω ανάλυση και τα κύτταρα ξεπλένονται με απιονισμένο νερό, φυγοκεντρούνται υπό ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στη συνέχεια, τα κύτταρα οδηγούνται για ξήρανση σε φούρνο στους 80 °C για τουλάχιστον 24 ώρες μέχρι να απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία στο δείγμα. Τέλος, τα erpendorf με τα κύτταρα τοποθετούνται σε ξηραντήρα (desiccator) για να απομακρυνθεί υγρασία που πιθανώς υπάρχει ακόμα και τελικώς ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Από το συνολικό βάρος, αφαιρείται το απόβαρο και με την κατάλληλη αναγωγή προκύπτει η συγκέντρωση της ξηρής βιομάζας εκφρασμένη σε g/L.

### 3.5.2 Προσδιορισμός σακχάρων

Ο προσδιορισμός των σακχάρων και των οργανικών οξέων στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), με το σύστημα SHIMADZU UFLC XR το οποίο ήταν εξοπλισμένο με στήλη Rezex ROA – Organic H<sup>+</sup> και ανιχνευτή Shimadzu RI. Για την κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θεικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) συγκέντρωσης 10mM. Η ροή ήταν ρυθμισμένη στο 0,6 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης στους 65 °C. Από την στήλη περνούσαν 10 µL δείγματος και η ανάλυση διαρκούσε 30 λεπτά. Επιπλέον, σε περιπτώσεις με περισσότερα από ένα σάκχαρα χρησιμοποιήθηκε η στήλη Shodex SP0810 σε σύστημα Shimadzu στους 80 °C, με κινητή φάση υπερκάθαρο νερό και ροή 0,5 mL/min.

### 3.5.3 Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων

Σε όλες τις ζυμώσεις πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (Free amino nitrogen, FAN) σύμφωνα με τη μέθοδο Lie (1973). Η συγκέντρωση του FAN αναφέρεται στο άζωτο που περιέχεται στις αμινομάδες των ελεύθερων αμινοξέων και των πεπτιδίων. Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου, το αραιωμένο δείγμα θερμαίνεται με νινυδρίνη σε pH 6-7 και το παραγόμενο χρώμα φωτομετρείται στα 570 nm. Η νινυδρίνη είναι ένας οξειδωτικός παράγοντας που προκαλεί οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση των α-αμινοξέων. Κατά τη διαδικασία παράγεται διοξείδιο του άνθρακα, αμμωνία, και μια αλδεΐδη με ένα άτομο άνθρακα λιγότερο σε σχέση με το αρχικό αμινοξύ. Η ανηγμένη νινυδρίνη αντιδρά με τη μη ανηγμένη μορφή της και με την NH<sub>3</sub> που απελευθερώνεται, παράγοντας ένα μπλε σύμπλοκο.

Ως προς την υλοποίηση της μεθόδου, προστίθεται 1 mL αραιωμένου δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα και 0,5 mL αντιδραστήριου χρώσης (Colour reagent: 49,71 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη ως αναγωγική ουσία, 60 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> για ρύθμιση pH και συμπλήρωση με dH<sub>2</sub>O μέχρι το 1L). Το μίγμα αναδεύεται σε vortex, ο σωλήνας πωματίζεται και οδηγείται σε υδατόλουτρο προς βρασμό για 16 λεπτά. Στη συνέχεια, τοποθετείται αμέσως σε πάγο για 20 λεπτά και κατόπιν προστίθενται 2,5 mL αντιδραστήριου αραιώσης (FAN dilution: 2 g KIO<sub>3</sub> διαλύονται σε 616 mL dH<sub>2</sub>O και προστίθεται αιθανόλη μέχρι 1 L). Το μίγμα αναδεύεται σε vortex για 20 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια φωτομετρείται στα 570 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-Vis (Jasco V-530). Ως τυφλό χρησιμοποιείται 1 mL απιονισμένο νερό. Η

συγκέντρωση του κάθε δείγματος εκφράζεται σε mg/L FAN και υπολογίζεται απ' την πρότυπη καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα γλυκίνης.

### 3.5.4 Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου

Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν το θειικό αμμώνιο και το χλωριούχο αμμώνιο ως πηγές αζώτου, ο προσδιορισμός της κατανάλωσής τους κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε με την ανίχνευση του αμμωνιακού αζώτου. Κατά τη διαδικασία αυτή, τοποθετούνται 50  $\mu\text{L}$  αραιωμένου δείγματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες και κατόπιν 2 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ , 1 mL φαινολικού διαλύματος καταλύτη και 1,5 mL αλκαλικού διαλύματος υποχλωριώδους. Έπειτα από διαδοχικές αναδεύσεις, τα τελικά μίγματα αφήνονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρούνται στα 635 nm. Η συγκέντρωση κάθε δείγματος σε αμμωνιακό άζωτο υπολογίζεται μέσω πρότυπης καμπύλης αναφοράς και εκφράζεται σε mg/L.

Το φαινολικό διάλυμα καταλύτη παρασκευάζεται με προσθήκη 6 g φαινόλης και 20 mg sodium nitroprusside σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος με  $\text{pH} \approx 9$ . Το αλκαλικό διάλυμα υποχλωριώδους παρασκευάζεται με προσθήκη 2 mL υποχλωριώδους νατρίου ( $\text{NaClO}$ ) σε 80 mL  $\text{NaOH}$  συγκέντρωσης 1N και συμπληρώνεται με  $\text{dH}_2\text{O}$  έως 200 mL τελικού όγκου.

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή του φαινολικού καταλύτη, προκύπτει με ανάμιξη 13 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 30 g  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και 3 g EDTA. Το μίγμα αραιώνεται σε τελικό όγκο 1 L και  $\text{pH} \approx 12$ .

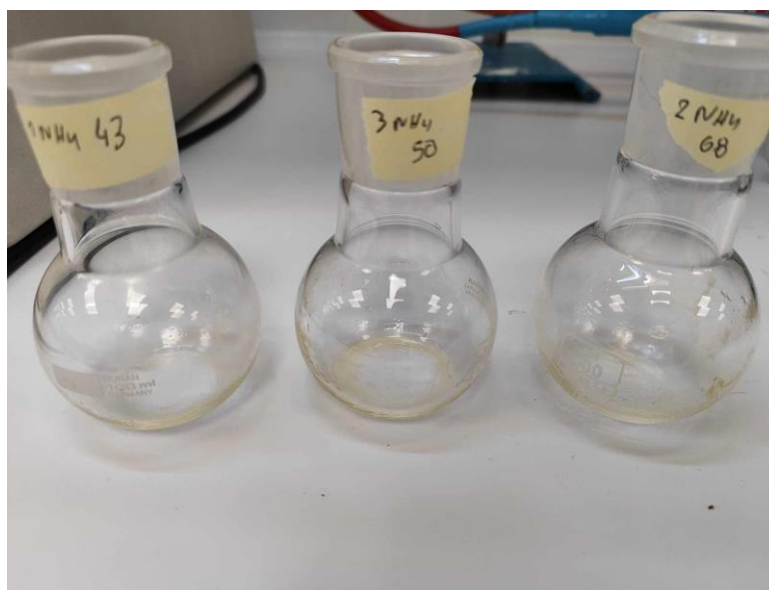
### 3.5.5 Ποσοτικός προσδιορισμός SCOs

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του λίπους που έχει συσσωρευτεί στα κύτταρα, απαιτείται διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος της βιομάζας και εκχύλιση με χρήση οργανικού διαλύτη. Για την πραγματοποίηση αυτής της διαδικασίας, λαμβάνονται σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα της ζύμωσης 30 mL δείγματος και τοποθετούνται σε προζυγισμένα φιαλίδια falcons. Το δείγμα φυγοκεντρείται (9000 rpm, 10 λεπτά,  $4^\circ\text{C}$ ) και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Η βιομάζα ξεπλένεται με  $\text{dH}_2\text{O}$  και φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες με το δείγμα. Κατόπιν, οδηγείται για λυοφιλοποίηση για 48 ώρες με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας. Με το πέρας της διαδικασίας, το δείγμα ζυγίζεται για να υπολογιστεί το καθαρό βάρος της ξηρής βιομάζας. Στη συνέχεια, το δείγμα κονιοροποιείται, προστίθεται διάλυμα Folch (χλωροφόρμιο/μεθανόλη 2:1) και το falcon οδηγείται στους υπερήχους για 30 λεπτά

για να υποβοηθηθεί η διάρρηξη των κυττάρων. Τέλος, τοποθετείται σε συνθήκες σκότους για 72 ώρες με σκοπό την αποφυγή της φωτοοξειδωσής των λιπαρών οξέων (Folch et al., 1957).

Για την απομάκρυνση του διαλύτη και την παραλαβή του μικροβιακού ελαίου, το δείγμα μεταφέρεται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη με τη βιομάζα να φιλτράρεται με διπλό διηθητικό χαρτί. Η φιάλη οδηγείται για εξάτμιση υπό κενό σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary Evaporator, BUCHI, R-114) στους 50 °C και ο διαλύτης απομακρύνεται. Μετά την εξάτμιση, η σφαιρική φιάλη στην οποία έχει παραμείνει το μικροβιακό έλαιο (Εικόνα 7) οδηγείται στον φούρνο (50 °C) για 30 λεπτά και μετά στον ξηραντήρα έως ότου επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν, ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, από αυτό αφαιρείται το απόβροτο της σφαιρικής φιάλης και προκύπτει το βάρος του μικροβιακού ελαίου, το οποίο ανάγεται σε g/L. Από το τελικό βάρος μπορεί να υπολογιστεί και η % περιεκτικότητα σε λίπος της κυτταρικής βιομάζας, σύμφωνα με την κάτωθι εξίσωση:

$$\% \text{ περιεκτικότητα σε λίπος} = \frac{\text{g λίπους}}{\text{g βιομάζας}} \times 100$$



**Εικόνα 7.** Μικροβιακό έλαιο μετά την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη

### 3.5.6 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους πραγματοποιείται μέσω αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography – GC), με την



μετατροπή των λιπαρών οξέων σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (Fatty Acid Methyl Esters, FAMES), λόγω της υψηλότερης πτητικότητας και χαμηλότερης πολικότητας των FAMES σε σχέση με τα λιπαρά οξέα. Για τη μετατροπή αυτή, προστίθενται 0,5 g μικροβιακού ελαίου σε δοκιμαστικό σωλήνα. Κατόπιν, προστίθενται 5 mL εξανίου χρωματογραφικής καθαρότητας και 1 mL μεθανολικού διαλύματος ΚΟΗ συγκέντρωσης 2M. Η μεθανόλη προτιμάται για τη διαδικασία της μετεστεροποίησης σε σχέση με άλλους διαλύτες, όπως η αιθανόλη, γιατί βοηθά στον καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ υδρόφιλης και υδρόφοβης φάσης των τριγλυκεριδίων (Battista et al., 2021). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται σε vortex για 30 δευτερόλεπτα και αφήνονται σε ηρεμία για 15 λεπτά. Με αυτή την αντίδραση, προκύπτει γλυκερόλη και μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, που διαχωρίζονται σε δυο φάσεις λόγω διαφοράς πολικότητας, με την άνω οργανική φάση να αποτελείται από τα FAMES. Από αυτή, παραλαμβάνονται 0,5 mL σε ειδικό φιαλίδιο για περαιτέρω ανάλυση.

Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται σε αναλυτή 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 ιοντισμού φλόγας (FID), με ήλιο (He) ως φέρον αέριο (1.1 mL/min). Ο φούρνος ρυθμίστηκε σε αρχική θερμοκρασία 100 °C και έπειτα θερμάνθηκε στους 200 °C με ρυθμό 5 °C ανά λεπτό και κατόπιν στους 245 °C με ρυθμό 3 °C ανά λεπτό, όπου εκεί παρέμεινε για 2 λεπτά. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ρυθμίστηκε στους 250 °C και 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).

## 4. Αποτελέσματα και συζήτηση

### 4.1 Ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και αξιολόγηση διαφορετικών πηγών αζώτου

Για την αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών πηγών αζώτου στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509 και την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και C/N = 70. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι ο εν λόγω μικροοργανισμός είναι ικανός να αναπτύσσεται και να παράγει μικροβιακά λιπίδια στις περισσότερες από τις υπό μελέτη πηγές. Η παραγωγή της βιομάζας κυμάνθηκε από 34,4 έως 42,2 g/L και η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων από 3,7 έως 14,8 g/L, με τις μέγιστες τιμές απόδοσης και παραγωγικότητας να παρατηρούνται με πηγή αζώτου την ουρία. Στις ζυμώσεις με νιτρικό κάλιο και νιτρώδες νάτριο, δεν παρατηρήθηκε κατανάλωση της γλυκόζης και παραγωγής βιομάζας. Τα συνολικά αποτελέσματα αυτής της ομάδας πειραμάτων περιγράφονται στον κάτωθι Πίνακα 3.

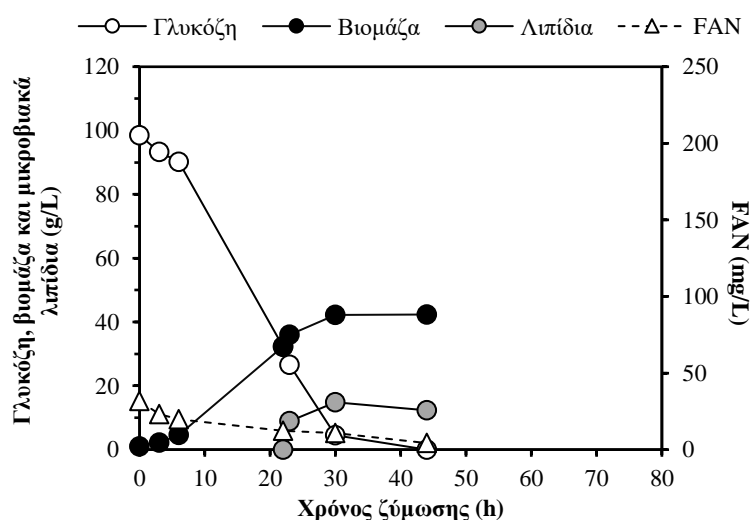
**Πίνακας 3:** Αποτελέσματα διαφορετικών πηγών αζώτου στις ασυνεχείς ζυμώσεις σε γλυκόζη

Πηγή N	Ώρες ζύμωσης (h)	Βιομάζα (g/L)	Λιπίδια (g/L)	Περιεκτικότητα σε λίπος (%)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/(L·h))
Ουρία	30	42,2	14,8	35,20	0,15	0,49
CSL	79	34,4	6,9	20,13	0,08	0,09
Πεπτόνη	57	36,2	9,7	26,83	0,10	0,17
Εκ. ζύμης	48	39,5	10,7	27,03	0,11	0,22
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	70	36,7	10,3	28,08	0,08	0,15
NH <sub>4</sub> Cl	53	40,0	3,7	9,24	0,04	0,07
KNO <sub>3</sub>				Δεν καταναλώθηκε		
NaNO <sub>2</sub>				Δεν καταναλώθηκε		

#### 4.1.1 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία

Η ουρία αποτελεί μια οργανική πηγή αζώτου, η συνεισφορά της οποίας ως πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο είναι αμελητέα σε σχέση με τη γλυκόζη (Awad et al., 2019). Σε αυτή τη ζύμωση, χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1,22 g/L, ενώ η γλυκόζη είχε συγκέντρωση 98,5 g/L και καταναλώθηκε πλήρως στις 44 ώρες, δίδοντας βιομάζα 42,4

g/L. Στις 30 ώρες ζύμωσης, απέμειναν 4,5 g/L γλυκόζης και η παραγωγή λιπιδίων έφτασε τα 14,8 g/L, με περιεκτικότητα σε ενδοκυτταρικό λίπος 35,20%, απόδοση 0,15 g λιπιδίων/g καταναλωθέντος σακχάρου και παραγωγικότητα 0,49 g/(L·h). Η αρχική συγκέντρωση FAN ήταν 31,7 mg/L και στις 44 ώρες ήταν 4,3 mg/L. Στις 44 ώρες ζύμωσης, παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση της γλυκόζης και η ποσότητα λιπιδίων ήταν 12,3 g/L, με τη μείωση να οφείλεται στον ενδογενή μεταβολισμό λόγω πείνας σε άνθρακα του μικροοργανισμού σε αυτό το χρονικό διάστημα, όπου οδήγησε στην κατανάλωση των συσσωρευμένων λιπιδίων (Ratledge, 1994) (Σχήμα 1).



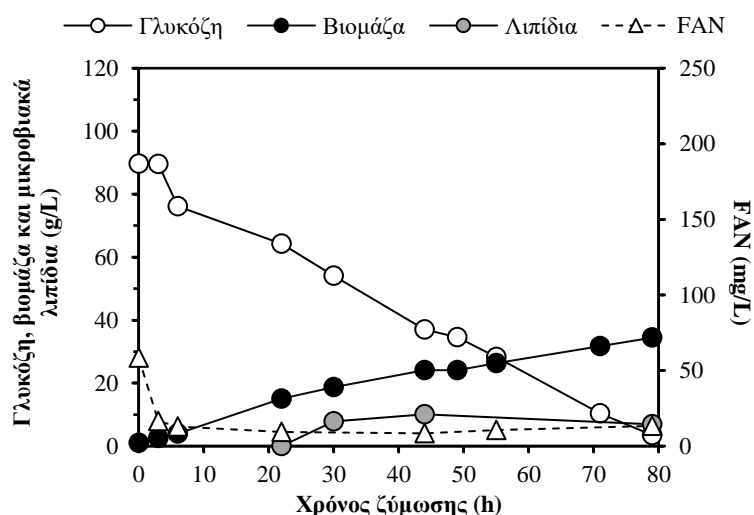
**Σχήμα 1:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία. Κατανάλωση γλυκόζης και FAN, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων

Στη μελέτη των Awad et al. (2019), η ουρία χρησιμοποιήθηκε ως οργανική πηγή αζώτου στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *C. curvatus* σε ασυνεχείς ζυμώσεις. Ο λόγος C/N διαμορφώθηκε στο 120, η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης στα 16 g/L και της ουρίας στα 0,13 g/L. Η βιομάζα ανήλθε στα 4,96 g/L και ήταν η μεγαλύτερη τιμή σε σχέση με τις υπόλοιπες πηγές αζώτου της ίδιας έρευνας, με εξαίρεση τη ζύμωση που χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης. Η παραγωγή λιπιδίων ανήλθε στα 1,82 g/L και η λιποπεριεκτικότητα στο 36,75%, που είναι σχεδόν ίση με τη λιποπεριεκτικότητα της ζύμωσης της παρούσας εργασίας.

#### 4.1.2 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL

Το CSL είναι ένα υγρό υποπροϊόν της άλεσης του καλαμποκιού που περιέχει σημαντικές ποσότητες αμινοξέων, βιταμινών και πολυπεπτιδίων, κάνοντας το μια εξαιρετική πηγή οργανικού αζώτου (Liu et al., 2015). Το CSL περιέχει 8% άζωτο και

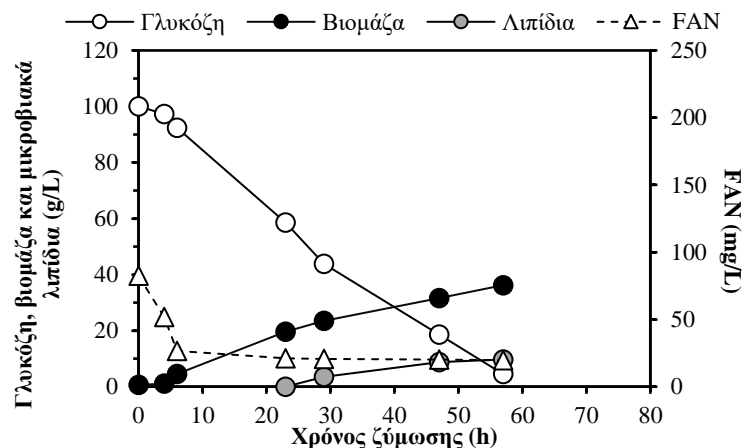
προστέθηκαν 7,14 g/L με σκοπό να επιτευχθεί ο λόγος C/N=70. Κατά τη χρησιμοποίησή του, η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 89,6 g/L και καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως (3,5 g/L) στις 79 ώρες ζύμωσης. Η παραχθείσα βιομάζα ήταν 34,4 g/L και η αρχική συγκέντρωση FAN 58,6 mg/L, που κατήλθε στα 13,3 mg/L έως το τέλος της καλλιέργειας. Στις 44 ώρες, ο μικροοργανισμός είχε καταναλώσει 52,5 g/L γλυκόζης, και είχαν παραχθεί 10,1 g/L λιπιδίων, η λιποπερικτικότητα ήταν 42,99% με απόδοση 0,19 g/g και η παραγωγικότητα 0,23 g/(L·h). Στις 79 ώρες ζύμωσης, υπήρξε μείωση στη συγκέντρωση των λιπιδίων, όπου η συγκέντρωσή τους βρέθηκε ίση με 6,9 g/L, η λιποπερικτικότητα 20,13%, η απόδοση της αντίδρασης 0,08 g/g και η παραγωγικότητα 0,09 g/(L·h). Στο Σχήμα 2 παρουσιάζονται τα δεδομένα.



**Σχήμα 2:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL. Κατανάλωση γλυκόζης και FAN, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων

#### 4.1.3 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη

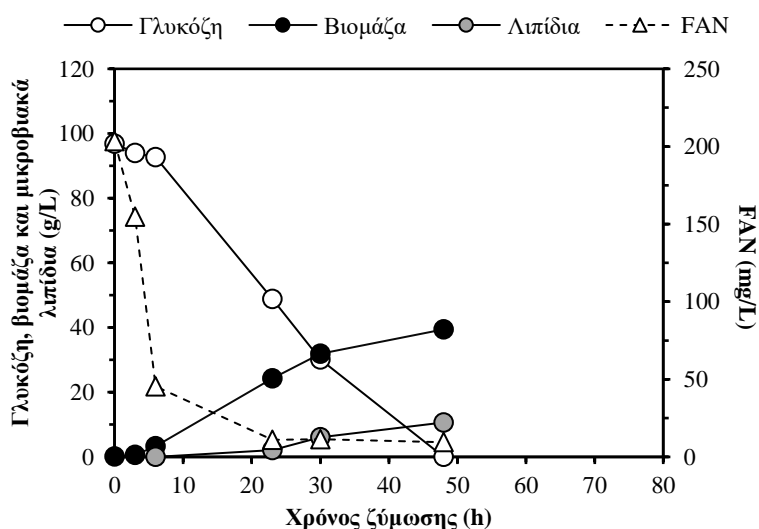
Η πηγή αζώτου που επιλέχθηκε σε αυτό το πείραμα ήταν η πεπτόνη, σε συγκέντρωση 3,69 g/L. Η συγκέντρωση της γλυκόζης στην έναρξη του πειράματος ήταν 100,1 g/L και καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως (έως 4,5 g/L) σε 57 ώρες ζύμωσης, με παραγωγή βιομάζας 36,2 g/L. Ως προς την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, αυτή ήταν 9,7 g/L και η λιποπερικτικότητα 26,83%. Η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,10 g/g και η παραγωγικότητα 0,17 g/(L·h). Η αρχική συγκέντρωση FAN ήταν 82,4 mg/L και καταναλώθηκαν έως τα 19,6 mg/L εντός 6 ωρών. Στο κάτωθι Σχήμα 3 παρουσιάζονται τα δεδομένα της ζύμωσης.



**Σχήμα 3:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη. Κατανάλωση γλυκόζης και FAN, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων

#### 4.1.4 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης

Στην ασυνεχή καλλιέργεια όπου χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση 5,19 g/L, η συγκέντρωση της γλυκόζης στην αρχή της ζύμωσης ήταν ίση με 96,9 g/L και καταναλώθηκε πλήρως έπειτα από 48 ώρες, δίδοντας 39,5 g/L βιομάζας και 10,7 g/L λιπιδίων. Η λιποπεριεκτικότητα έφτασε το 27,03%, η απόδοση της αντίδρασης 0,11 g/g και η παραγωγικότητα 0,22 g/(L·h). Το αρχικό FAN ήταν 203,4 mg/L και έπειτα από 23 ώρες είχε σχεδόν εξαντληθεί, φτάνοντας τα 11,1 mg/L. Στο Σχήμα 4 απεικονίζονται οι κινητικές της εν λόγω καλλιέργειας.

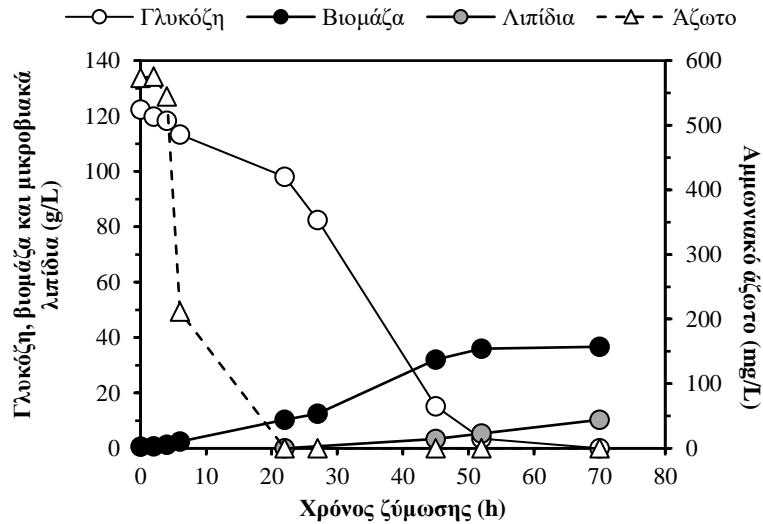


**Σχήμα 4:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης. Κατανάλωση γλυκόζης και FAN, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων

Στη μελέτη των Görner et al. (2015), με πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση 0,5 g/L και με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L, η παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 14 g/L. Η λιποπεριεκτικότητα έφτασε το 57% σε ίδιες συνθήκες με μόνη διαφορά την πηγή άνθρακα, όπου χρησιμοποιήθηκε η ξυλόζη σε συγκέντρωση 30 g/L. Στη μελέτη των Yu et al. (2014), ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (70 g/L) και πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης (5,6 g/L). Η βιομάζα ανήλθε στα 31,5 g/L και η λιποπεριεκτικότητα στο 40,3%. Οι Awad et al. (2019) μελέτησαν εκτενώς την παραγωγή βιομάζας και μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης, σε λόγους C/N μεταξύ 12:1 και 240:1. Η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας (24,3 g/L), παρατηρήθηκε σε λόγο C/N = 48, όπου η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 32 g/L και του εκχυλίσματος ζύμης 0,67 g/L. Αντιθέτως, η μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων (7,38 g/L) παρατηρήθηκε σε λόγο C/N = 90 με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 24 g/L. Σε λόγο C/N = 60, με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 8 g/L, η βιομάζα ανήλθε στα 9,75 g/L, η παραγωγή λιπιδίων στα 3,25 g/L και η λιποπεριεκτικότητα στο 33,78%, με την απόδοση της αντίδρασης να είναι χαμηλή (0,04 g/g). Όταν το C/N ρυθμίστηκε αρκετά χαμηλότερα από 60 (12, 30, 24, 36), η παραγωγή λιπιδίων κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα (μέχρι ~5 g/L) και η λιποπεριεκτικότητα ήταν μικρότερη από 20%. Ενδιαφέρον παρουσίασε ο λόγος C/N = 120, με διαφορετική αρχική συγκέντρωση γλυκόζης, 16 και 32 g/L. Στη δεύτερη περίπτωση ευνοήθηκε η παραγωγή βιομάζας με τη λιποπεριεκτικότητα να φτάνει το 27,48% ενώ στον ίδιο λόγο αλλά με τη μισή αρχική συγκέντρωση του σακχάρου (16 g/L), η περιεκτικότητα σε λιπίδια ανήλθε σε 44,36%.

#### **4.1.5 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .**

Κατά τη ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο σε συγκέντρωση 2,69 g/L, η γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης 122,3 g/L καταναλώθηκε πλήρως στις 70 ώρες, δίδοντας βιομάζα συγκέντρωσης 36,7 g/L. Η αρχική συγκέντρωση του αμμωνιακού αζώτου ήταν 573,1 mg/L και καταναλώθηκε πλήρως στις 22 ώρες, όπου και ξεκίνησε η ενδοκυτταρική λιποσυσσώρευση. Η μέγιστη παραγωγή λίπους ανήλθε στα 10,3 g/L και η περιεκτικότητα σε λίπος έφτασε το 28,08 % w/w. Η απόδοση ήταν 0,08 g/g και η παραγωγικότητα 0,15 g/(L·h). Στο Σχήμα 5 παρουσιάζονται αναλυτικά τα δεδομένα.

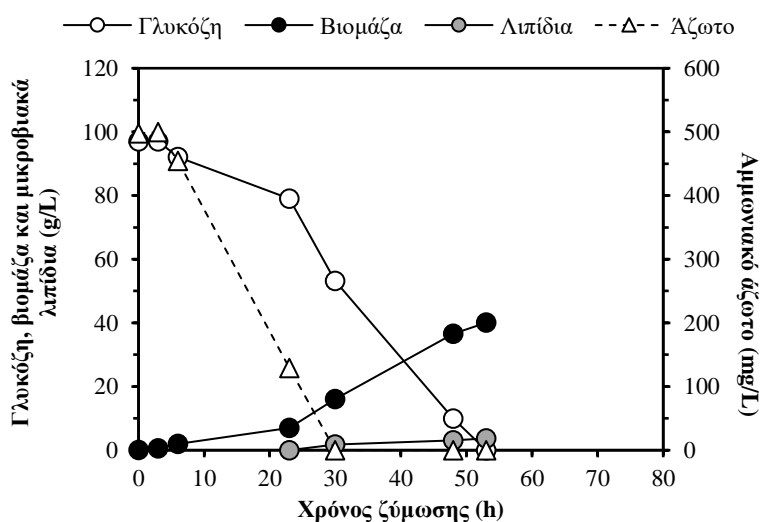


**Σχήμα 5:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο. Κατανάλωση γλυκόζης και αμμωνιακού αζώτου, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων

Στη μελέτη των Patel et al. (2018), για τη μελέτη της *de novo* βιοσύνθεσης λιπιδίων του μικροοργανισμού *C. curvatus* DSM-101032, χρησιμοποιήθηκε ως μοναδική πηγή άνθρακα η γλυκόζη (40 g/L) και ως πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ώστε να επιτευχθεί λόγος C/N μεταξύ 20 και 80. Για C/N = 20, η βιομάζα ανήλθε στα 11,32 g/L και με τη σταδιακή αύξηση του λόγου έως C/N = 80, η βιομάζα είχε περιοριστεί στα 6,28 g/L. Αντίθετα, ως προς τη συγκέντρωση των μικροβιακών λιπιδίων, η αύξηση του λόγου C/N ήταν ευνοϊκή, αφού για C/N = 20 η συγκέντρωση λιπιδίων ήταν 4,8 g/L και η περιεκτικότητα σε λίπος 42%. Για C/N = 40, η συγκέντρωση λιπιδίων ανήλθε στα 5,23 g/L και η περιεκτικότητα σε λίπος 52,66%. Περαιτέρω αύξηση του C/N οδήγησε σε μείωση της βιομάζας και των μικροβιακών λιπιδίων. Σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή βιομάζας (16 g/L και 14,5 g/L για συγκέντρωση 60 και 80 g/L αντίστοιχα), αλλά μειωμένη παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων όταν η γλυκόζη ήταν 40 g/L. Οι Awad et al. (2019) χρησιμοποίησαν γλυκόζη και θειικό αμμώνιο για την πραγματοποίηση ασυνεχούς ζύμωσης με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* σε λόγο C/N αρκετά υψηλότερο από τον χρησιμοποιούμενο στην παρούσα εργασία. Πιο συγκεκριμένα, σε λόγο C/N = 120, με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 16 g/L και θειικού αμμωνίου 0,13 g/L, η βιομάζα ανήλθε στα 1,93 g/L, η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων στα 0,32 g/L και η λιποπεριεκτικότητα στο 16,35%.

#### 4.1.6 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το χλωριούχο αμμώνιο, $\text{NH}_4\text{Cl}$

Στη ζύμωση με πηγή αζώτου το χλωριούχο αμμώνιο αρχικής συγκέντρωσης 2,18 g/L και 97,0 g/L γλυκόζης, όλη η ποσότητα του σακχάρου καταναλώθηκε σε 53 ώρες και η παραχθείσα βιομάζα ανήλθε σε 40,0 g/L. Το αρχικό αμμωνιακό άζωτο ήταν 497,9 mg/L και εξαντλήθηκε πλήρως στις 30 ώρες ζύμωσης, όπου και άρχισε η λιποσυσσώρευση. Το στέλεχος παράγαγε 3,7 g/L μικροβιακό λίπος με περιεκτικότητα 9,24% w/w (Σχήμα 6). Η απόδοση της καλλιέργειας ήταν 0,04 g/g και η παραγωγικότητα 0,07 g/(L·h).



**Σχήμα 6:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το χλωριούχο αμμώνιο. Κατανάλωση γλυκόζης και αμμωνιακού αζώτου, παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων

Οι Zheng et al. (2012), χρησιμοποιώντας γλυκόζη ως πηγή άνθρακα σε συγκέντρωση 20 g/L και χλωριούχο αμμώνιο ως πηγή αζώτου σε συγκέντρωση 1,57 g/L με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509, η βιομάζα έφτασε τα 10,5 g/L και η περιεκτικότητα σε λίπος το 13,7%. Ο ίδιος μικροοργανισμός χρησιμοποιήθηκε στην έρευνα των Awad et al. (2019) για την πραγματοποίηση ασυνεχούς ζύμωσης με λόγο C/N = 120, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 16 g/L και χλωριούχου αμμωνίου 0,13 g/L. Η βιομάζα ανήλθε στα 2,17 g/L, η παραγωγή λιπιδίων στα 0,35 g/L και η λιποπεριεκτικότητα 16,37%. Πρόκειται για παρόμοια αποτελέσματα, με μικρή διαφορά στην παραγωγή βιομάζας, με αυτά που αναγράφονται στην παράγραφο 4.1.1 και αφορούν στην ίδια έρευνα, δείχνοντας ότι σε αυτό τον λόγο C/N, η παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα για τα δυο αμμωνιακά άλατα, το θειικό αμμώνιο και το χλωριούχο αμμώνιο.



#### 4.1.7 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων στις ασυνεχείς ζυμώσεις με διαφορετικές πηγές αζώτου

Στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε γλυκόζη με διαφορετικές πηγές αζώτου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων. Η αξιολόγηση των μικροβιακών λιπιδίων έδειξε ότι κυριαρχεί η παρουσία του ελαϊκού οξέος (C18:1) σε ποσοστό που κυμαινόταν σε εύρος τιμών μεταξύ 34-49%, ακολουθούμενο από το παλμιτικό (C16:0) σε ποσοστά μεταξύ 25-42%. Αντίθετα, στη ζύμωση με το χλωριούχο αμμώνιο, το παλμιτικό οξύ ήταν το κυρίαρχο σε ποσοστό 40%. Ακολούθησαν το στεατικό (C18:0) και το λινελαϊκό οξύ ( $\Delta^{9,12}$ C18:2), ενώ το παλμιτελαϊκό ανιχνεύτηκε σε μικρότερες ποσότητες. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά των λιπαρών οξέων για τις ζυμώσεις με διαφορετικές πηγές αζώτου.

**Πίνακας 4:** Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων σε ασυνεχείς ζυμώσεις με διαφορετικές πηγές αζώτου

Πηγή αζώτου	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	Άλλα
Ουρία	28,46	0,64	9,92	49,00	9,70	2,27
CSL	31,80	0,74	9,46	45,60	9,33	3,09
Πεπτόνη	29,46	0,83	9,82	47,62	9,46	2,82
Εκχύλισμα ζύμης	31,75	0,40	6,26	43,66	6,39	11,54
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	34,95	0,87	7,65	36,86	7,12	12,55
NH <sub>4</sub> Cl	40,51	1,65	5,35	34,80	5,64	12,04

#### 4.2 Ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα εμπορικά σάκχαρα σε αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ

Η σύσταση των σακχάρων που προέκυψαν από την ενζυμική υδρόλυση του αποβλήτου καφέ ήταν: 48,2% μαννόζη, 34,6% γλυκόζη, 6,5% αραβινόζη, 6% ξυλόζη και 4,7% γαλακτόζη. Για τις ζυμώσεις αυτού του κεφαλαίου χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα τα εμπορικά σάκχαρα ίδιας αναλογίας με αυτά του υδρολύματος του αποβλήτου καφέ με συνολική αρχική συγκέντρωση 100 g/L. Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν η ουρία, το CSL και το θειικό αμμώνιο και ο λόγος C/N

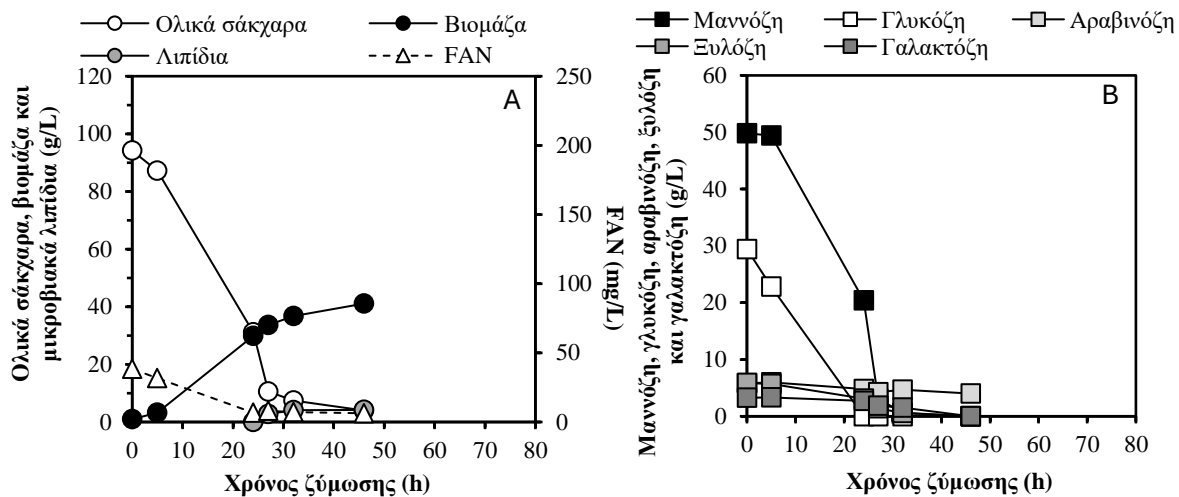
διατηρήθηκε σταθερός στο 70. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 είναι ικανός να αναπτύσσεται στο συγκεκριμένο υπόστρωμα και στις υπό μελέτη πηγές αζώτου. Η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας (41,1 g/L) σημειώθηκε στη ζύμωση με την ουρία έπειτα από 46 ώρες ενώ η μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων παρατηρήθηκε με το θειικό αμμώνιο (13,20 g/L) έπειτα από 45 ώρες ζύμωσης. Ως προς την απόδοση παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων ανά g αρχικών σακχάρων, η μεγαλύτερη επετεύχθη με το θειικό αμμώνιο (0,14 g/g) ενώ η μέγιστη παραγωγικότητα παρατηρήθηκε στην ίδια ζύμωση (0,29 g/(L·h)). Τα συνολικά αποτελέσματα αυτής της ομάδας πειραμάτων περιγράφονται στον κάτωθι Πίνακα 5.

**Πίνακας 5:** Αποτελέσματα διαφορετικών πηγών αζώτου στις ασυνεχείς ζυμώσεις σε εμπορικά σάκχαρα σε αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ

Πηγή N	Ωρες					
	ζύμωσης (h)	Βιομάζα (g/L)	Λιπίδια (g/L)	Περιεκτικότητα σε λίπος (%)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/(L·h))
Ουρία	46	41,1	4,2	10,18	0,04	0,09
CSL	93	32,6	11,0	33,82	0,11	0,12
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	45	37,5	13,2	33,91	0,14	0,29

#### 4.2.1 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία

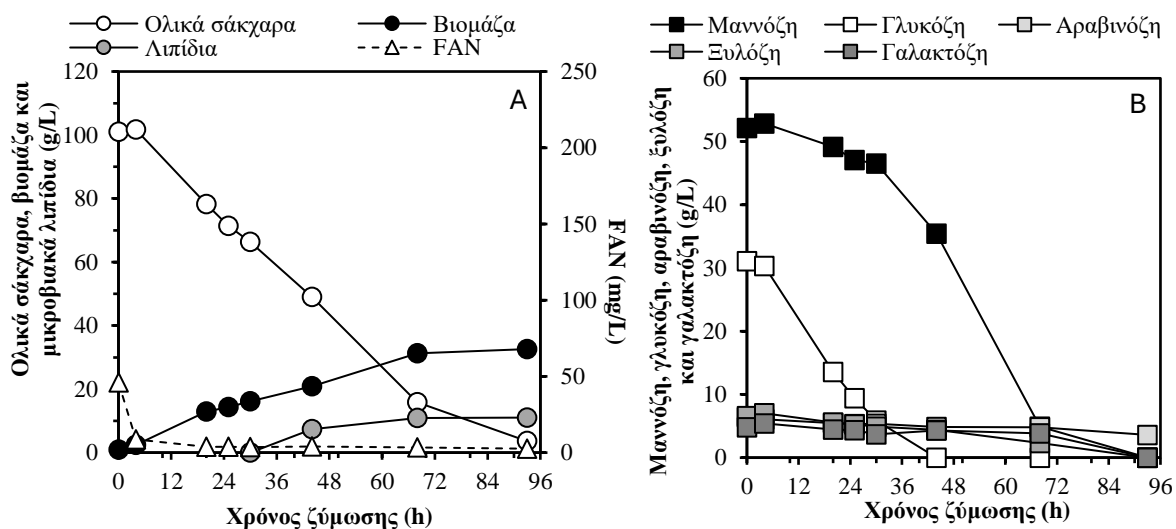
Στη ζύμωση αυτή ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 αναπτύχθηκε σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων 94,2 g/L και ουρίας 1,22 g/L. Στις 46 ώρες, η συγκέντρωση σακχάρων έφτασε τα 4 g/L, με την ποσότητα αυτή να αφορά στην αραβινόζη. Η βιομάζα ανήλθε στα 41,1 g/L, τα λιπίδια στα 4,2 g/L και η λιποπεριεκτικότητα στο 10,18%. Η απόδοση και η παραγωγικότητα ήταν 0,04 g/g και 0,09 g/(L·h), αντίστοιχα. Το FAN εκκινούσε από τα 38,4 mg/L και στο τέλος της ζύμωσης ήταν 6,3 mg/L. Στο Σχήμα 7 παρουσιάζονται τα δεδομένα.



**Σχήμα 7:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία. (A) Κατανάλωση FAN και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (B) Κινητική κατανάλωσης εμπορικών σακχάρων

#### 4.2.2 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL

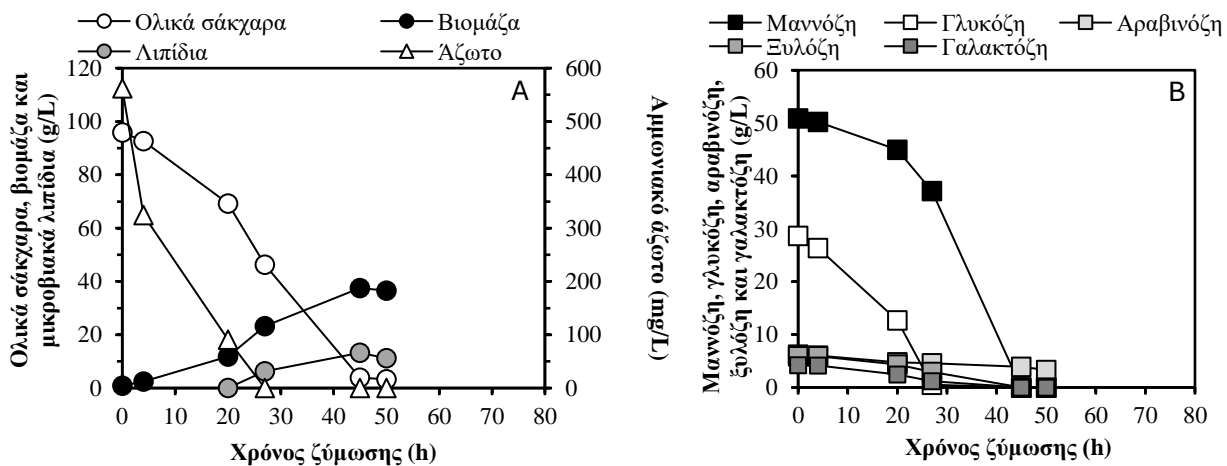
Στην επόμενη ζύμωση χρησιμοποιήθηκε το CSL σε συγκέντρωση 7,14 g/L, με την αρχική συγκέντρωση σακχάρων να είναι 101,0 g/L. Στις 68 ώρες ζύμωσης είχαν απομείνει 15,9 g/L σακχάρων ενώ στις 93 είχαν καταναλωθεί όλα πλην της αραβινόζης (3,6 g/L). Η βιομάζα ήταν 32,6 g/L, τα μικροβιακά λιπίδια 11,0 g/L, και η λιποπεριεκτικότητα 33,82%. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 0,11 g/g και η παραγωγικότητα 0,12 g/(L·h). Το FAN εκκινούσε από 46,0 mg/L και καταναλώθηκε στις 20 ώρες. Αναλυτικά τα δεδομένα της ζύμωσης στο Σχήμα 8.



**Σχήμα 8:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL. (A) Κατανάλωση FAN και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (B) Κινητική κατανάλωσης εμπορικών σακχάρων

### 4.2.3 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο

Τέλος, εξετάστηκε η ικανότητα ανάπτυξης του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 95,9 g/L και θειικού αμμωνίου 2,69 g/L. Στις 45 ώρες ζύμωσης είχαν καταναλωθεί όλα τα σάκχαρα, πλην της αραβινόζης όπου είχαν απομείνει 3,9 g/L. Η βιομάζα στις 45 ώρες ανήλθε στα 37,5 g/L ενώ στις 50 υπήρξε πτώση στα 36,5 g/L. Η συγκέντρωση των παραγόμενων λιπιδίων στις 45 ώρες ήταν 13,2 g/L και στις 50 11,2 g/L, με τη λιποσυσσώρευση να είναι 33,91% και 30,71% αντίστοιχα. Μετά τις 45 ώρες ζύμωσης ο μικροοργανισμός δε δύναται να καταναλώσει περαιτέρω σάκχαρα (αραβινόζη) και εκκινεί ο ενδογενής μεταβολισμός με κατανάλωση των συσσωρευμένων λιπιδίων η οποία συμβαίνει στους μικροοργανισμούς σε συνθήκες πείνας άνθρακα (Ratledge, 1994). Η απόδοση της ζύμωσης στις 45 ώρες ήταν 0,14 με την παραγωγικότητα να είναι 0,29 g/(L·h). Η αρχική συγκέντρωση αμμωνιακού αζώτου ήταν 562,4 mg/L και καταναλώθηκε στις 27 ώρες. Στο Σχήμα 9 φαίνονται αναλυτικά τα δεδομένα.



**Σχήμα 9:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο. (A) Κατανάλωση αμμωνιακού αζώτου και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (B) Κινητική κατανάλωσης εμπορικών σακχάρων

### 4.2.4 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων στις ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα εμπορικά σάκχαρα σε αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ

Στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε υπόστρωμα εμπορικών σακχάρων σε αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ και πηγές αζώτου την ουρία, το

CSL και το θειικό αμμώνιο, έγινε ανάλυση του μικροβιακού λίπους με σκοπό τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων. Το ελαϊκό οξύ (C18:1) βρέθηκε στο μεγαλύτερο ποσοστό, κοντά στο 50%, με εξαίρεση τη ζύμωση που χρησιμοποιήθηκε η ουρία, όπου ανιχνεύτηκε σε μικρότερο ποσοστό (32%). Το αμέσως επόμενο λιπαρό οξύ ήταν το παλμιτικό (C16:0), σε ποσοστά μεταξύ 25-42% ενώ ακολούθησαν το στεατικό (C18:0), το λινελαϊκό ( $\Delta^{9,12}$ C18:2) και το παλμιτελαϊκό. Στον Πίνακα 6, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά των λιπαρών οξέων.

**Πίνακας 6:** Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων σε ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα εμπορικά σάκχαρα σε αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ

Πηγή αζώτου	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	Άλλα
Urea	42,86	1,54	4,83	32,86	7,10	10,82
CSL	34,38	0,88	9,97	45,45	7,07	2,25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25,51	0,86	11,49	48,66	11,11	2,38

### 4.3 Ασυνεχείς ζυμώσεις σε υδρόλυμα αποβλήτου καφέ

#### 4.3.1 Παραγωγή υδρολύματος αποβλήτου καφέ πλούσιου σε σάκχαρα

Τα SCGs που χρησιμοποιήθηκαν είχαν παραληφθεί από τοπικά καταστήματα εστίασης, με το έλαιο και τα φαινολικά συστατικά να εκχυλίζονται πριν τη διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης. Το υδρόλυμα αποβλήτου καφέ που παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.1, οδηγήθηκε για συμπύκνωση με σκοπό να επιτευχθεί αρχική συγκέντρωση σακχάρων 100 g/L. Κατόπιν ανάλυσης μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, παρατηρείται η περιεκτικότητα σε σάκχαρα που περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.2.

Για την αξιολόγηση της επίδρασης του υδρολύματος αποβλήτου καφέ στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες όπου το πλούσιο σε σάκχαρα υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα και η ουρία, το CSL και το θειικό αμμώνιο ως πηγές αζώτου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με αυτό το υπόστρωμα μπορεί να παραχθούν ικανοποιητικές ποσότητες βιομάζας και μικροβιακών λιπιδίων, που άγγιζαν τα 42,1 g/L και τα 15 g/L αντίστοιχα, με τις αποδόσεις των ζυμώσεων να κυμαίνονται από 0,11–

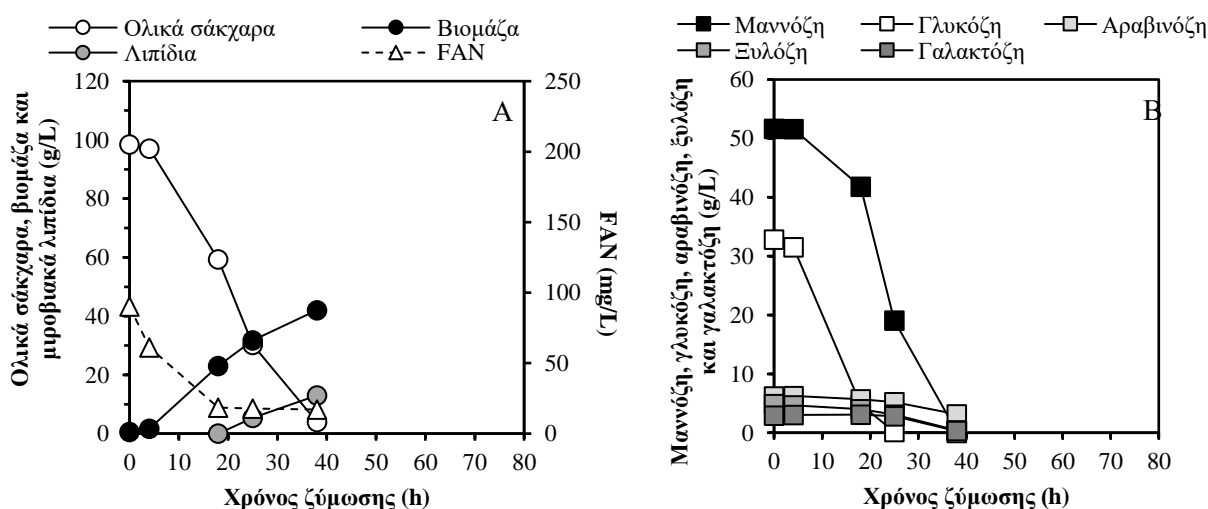
0,16 g/g. Τα συνολικά αποτελέσματα αυτής της ομάδας πειραμάτων περιγράφονται στον παρακάτω Πίνακα 7.

**Πίνακας 7:** Αποτελέσματα διαφορετικών πηγών αζώτου στις ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα υδρολύματος αποβλήτου καφέ

Πηγή N	Ωρες					
	ζύμωσης (h)	Βιομάζα (g/L)	Λιπίδια (g/L)	Περιεκτικότητα σε λίπος (%)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/(L·h))
Ουρία	38	42,1	13,0	30,92	0,13	0,34
CSL	68	41,0	15,8	38,46	0,16	0,23
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	37	41,7	11,2	26,94	0,11	0,30

#### 4.3.2 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία

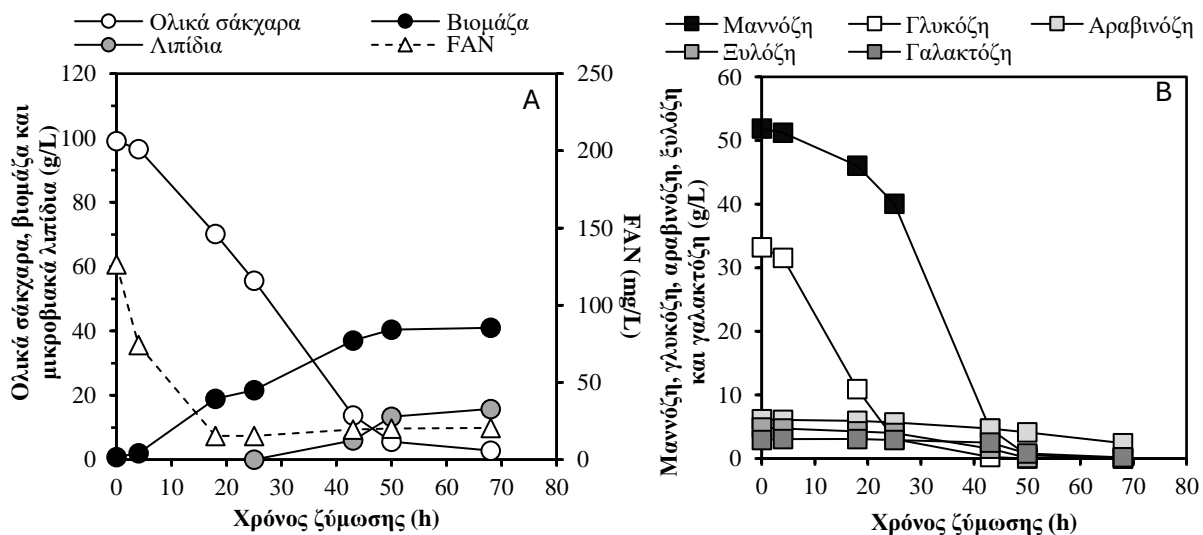
Κατά την ανάπτυξη του *C. curvatus* ATCC 20509 σε υδρόλυμα αποβλήτου καφέ με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 98,5 g/L και πηγή αζώτου την ουρία σε συγκέντρωση 1,22 g/L, η βιομάζα ανήλθε στα 42,1 g/L στις 38 ώρες ζύμωσης με πλήρη κατανάλωση όλων των σακχάρων πλην της αραβινόζης, όπου είχαν απομείνει 3,14 g/L. Τα λιπίδια έφτασαν τα 13,0 g/L και η λιποπεριεκτικότητα το 30,92%. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 0,13 g/g και η παραγωγικότητα 0,34 g/(L·h). Το FAN εκκινούσε από τα 90,2 mg/L και στις 38 ώρες ήταν 17,1 mg/L. Στο Σχήμα 10 παρουσιάζονται αναλυτικά τα δεδομένα.



**Σχήμα 10:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία. (A) Κατανάλωση FAN και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (B) Κινητική κατανάλωσης σακχάρων του υδρολύματος

### 4.3.3 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL

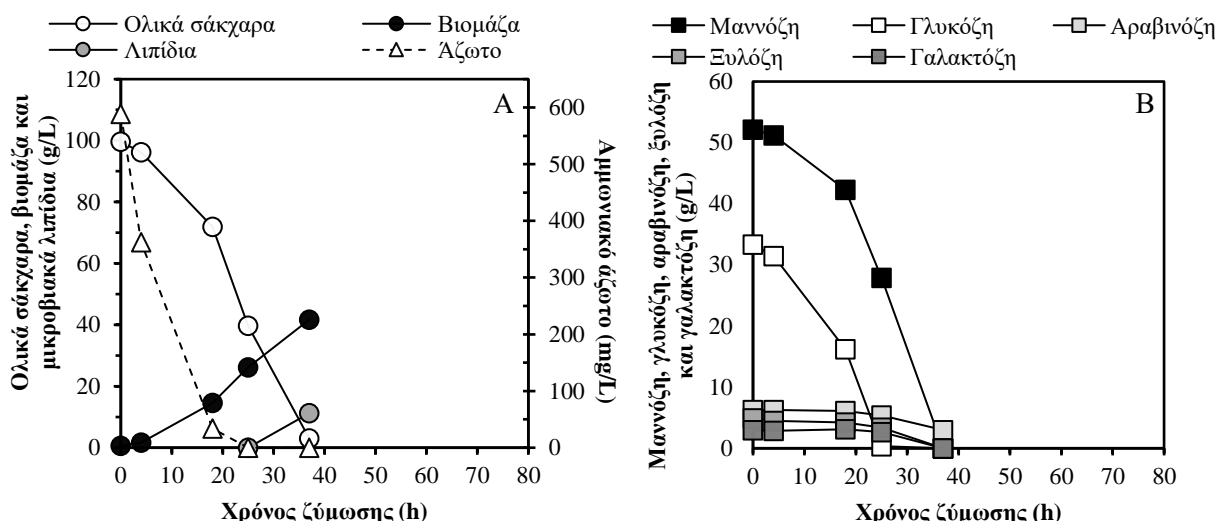
Το CSL χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου σε αυτή τη ζύμωση σε συγκέντρωση 7,14 g/L και η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 99,0 g/L. Στις 68 ώρες ζύμωσης είχαν εξαντληθεί σχεδόν πλήρως όλα τα σάκχαρα εκτός της αραβινόζης που είχαν απομείνει 2,4 g/L. Η βιομάζα ανήλθε στα 41,0 g/L και τα λιπίδια στα 15,8 g/L με λιποπεριεκτικότητα 38,46%. Η απόδοση και η παραγωγικότητα ανήλθαν στα 0,16 g/g και 0,23 g/(L·h) αντίστοιχα. Το αρχικό FAN ήταν 126,5 mg/L και στις 68 ώρες είχε φτάσει στα 20,5 mg/L. Αναλυτικά τα δεδομένα στο Σχήμα 11.



**Σχήμα 11:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το CSL. (Α) Κατανάλωση FAN και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (Β) Κινητική κατανάλωσης σακχάρων του υδρολύματος

### 4.3.4 Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο

Σε αυτή τη ζύμωση εξετάστηκε η ικανότητα του *C. curvatus* ATCC 20509 να αναπτύσσεται σε υδρόλυμα αποβλήτου καφέ με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 99,6 g/L και πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο, αρχικής συγκέντρωσης 2,69 g/L. Στις 37 ώρες ζύμωσης η βιομάζα ήταν 41,7 g/L, τα λιπίδια 11,2 g/L και η λιποπεριεκτικότητα 26,94%. Η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,11 g/g και η παραγωγικότητα 0,30 g/(L·h). Το αρχικό αμμωνιακό άζωτο ήταν 588,8 mg/L και καταναλώθηκε πλήρως στις 18 ώρες ζύμωσης. Τα ανωτέρω περιγράφονται στο Σχήμα 12.



**Σχήμα 12:** Ασυνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο. (Α) Κατανάλωση αμμωνιακού αζώτου και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (Β) Κινητική κατανάλωσης σακχάρων του υδρολύματος

#### 4.3.5 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων στις ασυνεχείς ζυμώσεις με υπόστρωμα υδρόλυμα αποβλήτου καφέ

Ως προς τα μικροβιακά λιπίδια τα οποία παρήχθησαν, με σκοπό την εύρεση των λιπαρών οξέων από τα οποία αποτελούνται πραγματοποιήθηκε μετεστεροποίηση, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.6.6. Κατόπιν ανάλυσης παρατηρήθηκε ότι κυρίαρχο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό (C18:1) και στις τρεις ζυμώσεις, με το ποσοστό του να κυμαίνεται κοντά στο 50%. Ακολούθησε το παλμιτικό οξύ (C16:0) με το ποσοστό του να κυμαίνεται μεταξύ 18 - 24%, το στεατικό οξύ (C18:0) με εύρος από 10 έως 13% και το λινελαϊκό οξύ ( $\Delta^{9,12}$ C18:2) σε ποσοστό 5-10%. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα βρέθηκαν σε πολύ μικρότερα ποσοστά. Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των λιπαρών οξέων για τις τρεις ζυμώσεις αυτού του κεφαλαίου.

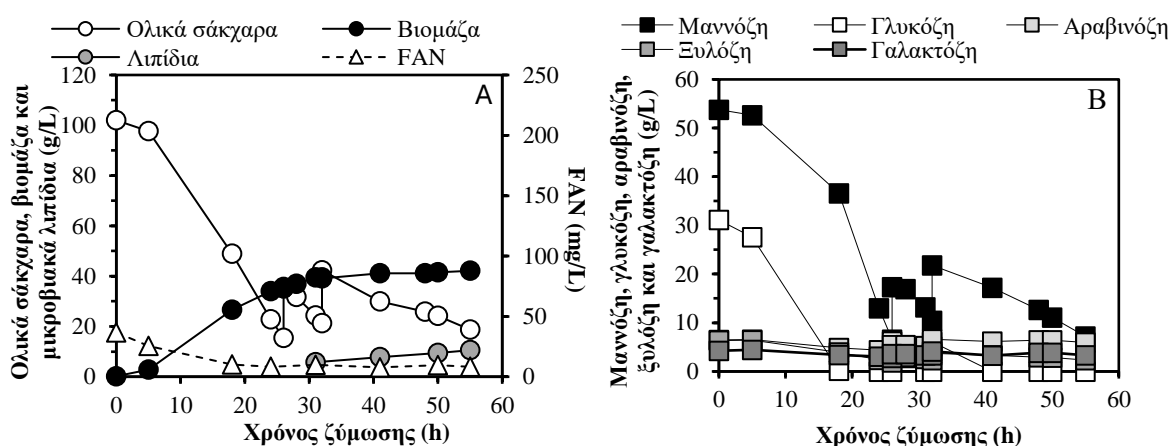
**Πίνακας 8:** Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων σε ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα υδρόλυμα καφέ.

Πηγή αζώτου	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	Άλλα
Urea	21,45	0,79	13,83	43,51	5,78	14,65
CSL	25,47	0,47	11,00	50,95	8,26	3,85
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24,79	0,74	12,68	49,90	10,46	1,43



#### 4.4 Ημι-συνεχής ζύμωση με πηγή άνθρακα εμπορικά σάκχαρα σε αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ

Ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 καλλιεργήθηκε σε ημι-συνεχή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα χωρητικότητας 6,7 L (Bioengineering, RALF Advanced), με ενεργό όγκο 3 L. Η πηγή άνθρακα ήταν τα εμπορικά σάκχαρα σε αρχική συγκέντρωση 101,9 g/L και αναλογία αντίστοιχη αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε η ουρία σε συγκέντρωση 1,22 g/L. Στις 55 ώρες η βιομάζα ανήλθε στα 42,1 g/L και τα λιπίδια στα 10,6 g/L που αντιστοιχούν σε λιποπεριεκτικότητα 25,06%. Η απόδοση της καλλιέργειας ήταν 0,09 g λιπιδίων/g καταναλωθέντων σακχάρων και η παραγωγικότητα 0,19 g/(L·h). Το FAN εκκινούσε από τα 36,7 mg/L και στις 55 ώρες ήταν 8,3 mg/L. Τα δεδομένα της ημι-συνεχούς καλλιέργειας παρουσιάζονται στο παρακάτω Σχήμα 13.



**Σχήμα 13:** Ημι-συνεχής ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία. (Α) Κατανάλωση FAN και ολικών σακχάρων, παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. (Β) Κινητική κατανάλωσης εμπορικών σακχάρων

Ημι-συνεχής ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *Trichosporon oleaginosus* σε βιοαντιδραστήρα, πραγματοποιήθηκε στη μελέτη των Meo et al. (2017). Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε μίγμα σακχάρων με σύσταση: 60% γλυκόζη, 20% μαννόζη και 20% γαλακτόζη, με τον λόγο C/N να είναι 15 και πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο. Η συσσώρευση μικροβιακών λιπιδίων έφτασε το 58%, η απόδοση το 0,11 g/g και η βιομάζα ανήλθε στα 35,5 g/L, σε 72 ώρες ζύμωσης.

Οι Giannakis et al. (2023) πραγματοποίησαν ημι-συνεχή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα χωρητικότητας 30 L, με ενεργό όγκο 20 L, με υπόστρωμα υδρόλυμα αποβλήτου καφέ με σύσταση που περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.2. Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν 100 g/L και ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση 6 g/L. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης υπήρχε τροφοδοσία σακχάρων (feeding) ώστε η συγκέντρωσή τους στο μέσο της ζύμωσης να διατηρούνταν σταθερή στα 20-40 g/L. Ο μικροοργανισμό που χρησιμοποίησαν ήταν ο *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 και μετά από 169 ώρες ζύμωσης η βιομάζα ήταν 87,4 g/L, τα λιπίδια 40,2 g/L και αντιστοιχούσαν σε λιποσυσσώρευση 46%, με απόδοση 0,13 g/g και παραγωγικότητα 0,24 g/(L·h). Ως προς τα λιπαρά οξέα του μικροβιακού ελαίου, κυριάρχησαν το ελαϊκό και το παλμιτικό οξύ.

#### 4.4.1 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων στην ημι-συνεχή ζύμωση με πηγή άνθρακα τα εμπορικά σάκχαρα κατ' αναλογία αυτών του υδρόλυματος αποβλήτου καφέ

Κατά την ημι-συνεχή ζύμωση ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγμα για να αναλυθεί η σύστασή του σε λιπαρά οξέα. Το κυρίαρχο λιπαρό οξύ ήταν το ελαϊκό (C18:1) και ακολούθησε το παλμιτικό (C16:0), σε ποσοστά μεταξύ 38–45% και 30 – 36% αντίστοιχα. Το στεατικό οξύ (C18:0) βρέθηκε σε ποσοστά 5 – 8%, το λινελαϊκό ( $\Delta^{9,12}$ C18:2) κοντά στο 10% και το παλμιτελαϊκό περίπου 1%. Η σύσταση αυτή παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Αναλυτικά τα ποσοστά απεικονίζονται στον παρακάτω Πίνακα 9

**Πίνακας 9:** Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακών λιπιδίων στην ημι-συνεχή ζύμωση

Χρόνος ζύμωσης (h)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	Άλλα
31	36,93	0,92	6,24	42,62	8,99	4,30
41	34,34	0,72	5,82	42,89	9,24	6,99
50	30,38	0,41	8,01	38,27	9,01	13,91
55	32,03	0,50	8,39	45,12	9,89	4,07

## 5. Συμπεράσματα

Στη διπλωματική αυτή εργασία, αξιολογήθηκε η δυνατότητα του *C. curvatus* 20509 να αναπτύσσεται και να παράγει ενδοκυτταρικά λιπίδια σε διαφορετικές πηγές αζώτου, όσο και σε υδρόλυμα αποβλήτου καφέ ως υπόστρωμα.

Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και διαφορετικές πηγές αζώτου (ουρία, CSL, πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, θειικό αμμώνιο, χλωριούχο αμμώνιο, νιτρικό κάλιο, νιτρώδες νάτριο) με λόγο C/N = 70. Στη συνέχεια, ο μικροοργανισμό καλλιεργήθηκε σε μίγμα εμπορικών σακχάρων κατ' αναλογία αυτών του υδρολύματος αποβλήτου καφέ καθώς και σε υπόστρωμα που προέκυψε από την ενζυμική υδρόλυση του αποβλήτου αυτού, με πηγές αζώτου την ουρία, το CSL και το θειικό αμμώνιο. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής ζύμωση με τα εμπορικά σάκχαρα του υδρολύματος αποβλήτου καφέ και πηγή αζώτου την ουρία.

Βάσει της ανωτέρω ερευνητικής δραστηριότητας, εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- ❖ Ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 αναπτύχθηκε και παρήγαγε λίπος στις περισσότερες από τις υπό μελέτη πηγές αζώτου, με εξαίρεση τις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν νιτρικά άλατα.
- ❖ Στις ασυνεχείς ζυμώσεις με οργανικές πηγές αζώτου, η μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων παρουσιάστηκε στην περίπτωση της ουρίας με 14,8 g/L, που αντιστοιχούσε σε 35,20% λιποπεριεκτικότητα.
- ❖ Στις ασυνεχείς ζυμώσεις με ανόργανες πηγές αζώτου, η μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων παρουσιάστηκε στην περίπτωση του θειικού αμμωνίου με 10,3 g/L, που αντιστοιχούσε σε 28,08% λιποπεριεκτικότητα.
- ❖ Στις ασυνεχείς ζυμώσεις με το υδρόλυμα του αποβλήτου καφέ παρατηρήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τα αντίστοιχα των εμπορικών σακχάρων.
- ❖ Κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με εμπορικά σάκχαρα και πηγή αζώτου την ουρία παρατηρήθηκε ίδια παραγωγή βιομάζας αλλά μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων σε σχέση με την αντίστοιχη ασυνεχή ζύμωση.
- ❖ Κατά την ανάλυση των μικροβιακών λιπιδίων, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο προφίλ των λιπαρών οξέων, με το ελαϊκό και το παλμιτικό να είναι τα κυρίαρχα σε όλες τις ζυμώσεις.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.
- Apostolakou, A.A, Kookos, I.K., Marazioti, C., & Angelopoulos, K.C. (2009). Techno-economic analysis of a biodiesel production process from vegetable oils. *Fuel Processing Technology*, *90*(7-8), 1023-1031
- Arias, A., Ioannidou, S. M., Giannakis, N., Feijoo, G., Moreira, M. T., & Koutinas, A. (2023). Review of potential and prospective strategies for the valorization of coffee grounds within the framework of a sustainable and circular bioeconomy. *Industrial Crops & Products*, *205*, 117504.
- Athenaki, M., Gardeli, C., Diamantopoulou, P., Tchakouteu, S. S., Sarris, D., Philippoussis, A., & Papanikolaou, S. (2017). Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *Journal of Applied Microbiology*, *124*(2), 336-367.
- Awad, D., Bohnen, F., Mehlmer, N., & Brueck, T. (2019). Multi-Factorial-Guided Media Optimization for Enhanced Biomass and Lipid Formation by the Oleaginous Yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosus*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*, 54.
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(12), 3493-3503.
- Barampouti, E. M., Mai, S., Malamis, D., Moustakas, K., & Loizidou, M. (2019). Liquid biofuels from the organic fraction of municipal solid waste: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *110*, 298-314.
- Bardhan, S. K., Gupta, S., Gorman, M. E., & Haider, M. A. (2015). Biorenewable chemicals: Feedstocks, technologies and the conflict with food production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *51*, 506-520.
- Battista, F., Zuliani, L., Rizzioli, F., Fusco, S., & Bolzonella, D. (2021). Biodiesel, biogas and fermentable sugars production from Spent coffee Grounds: A cascade biorefinery approach. *Bioresource Technology*, *342*(4), 125952.
- Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E., Aggeli, D., Elazzazy, A. M., Baeshen, M. N., & Aggelis, G. (2016). Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Current Opinion in Biotechnology*, *37*, 24-35.
- 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.
- Bharathiraja, B., Sridharan, S., Sowmya, V., Yuvaraj, D., & Praveenkumar, R. (2017). Microbial oil: A plausible alternate resource for food and fuel application. *Bioresource Technology*, *233*(9), 423-432.
- Brown, D. A. (2001). Lipid droplets: Proteins floating on a pool of fat. *Current Biology*, *11*(11), 446-449.

- Caetano, N. S., Silva, V. F. M., Melo, A. C., Martins, A. A., & Mata, T. M. (2014). Spent coffee grounds for biodiesel production and other applications. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *16*(7), 1423-1430.
- Campos -Vega, R., Loarca-Piña, G., Vergara-Castaneda, H. A., & Oomah, B. D. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, *45*(1), 24-36.
- Certik, M., & Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *87*(1), 1-14.
- Efthymiopoulos, I., Hellier, P., Ladommatos, N., Russo-Profilo, A., Eveleigh, A., Aliev, A., Kay, A., & Mills-Lamptey, B. (2018). Influence of solvent selection and extraction temperature on yield and composition of lipids extracted from spent coffee grounds. *Industrial Crops & Products*, *119*, 49-56.
- European Commission, Eurostat. (2023). [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Glossary:Municipal\\_waste](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Glossary:Municipal_waste)
- European Commission, Eurostat. (2024a). <https://ec.europa.eu/eurostat/web/interactive-publications/energy-2024>
- European Commission, Eurostat. (2024b). <https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/SEPDF/cache/10360.pdf>
- European Commission, Eurostat. (2024c). <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/w/ddn-20240208-2>
- European Commission. (2024). [https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/farm-fork-strategy/food-loss-and-waste-prevention\\_en](https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/farm-fork-strategy/food-loss-and-waste-prevention_en)
- FAO. (2024). <https://www.fao.org/family-farming/detail/en/c/1681058/>
- Fiorentino, G., Ripa, M., & Ulgiati, S. (2016). Chemicals from biomass: technological versus environmental feasibility. A review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *11*(1), 195-214.
- 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.
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., & Shinohara, Y. (2008). Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochemistry and Cell Biology*, *130*(20), 263-279.
- Giannakis, N., Carmona-Cabello, M., Makri, A., Leiva-Candia, D., Filippi, K., Argeiti, C., Pateraki, C., Dorado, M. P., Koutinas, A., & Stylianou, E. (2023). Spent Coffee grounds and orange peel residues based biorefinery for microbial oil and biodiesel conversion estimation. *Renewable Energy*, *209*, 382-392.
- Giroto, F., Pivato, A., Cossu, R., Nkeng, G. E., & Lavagnolo, M. C. (2018). The broad spectrum of possibilities for spent coffee grounds valorisation. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, *20*, 695-701.
- Görner, C., Redai, V., Bracharz, F., Schrepfer, P., Garbe, D., & Brück, T. (2016). Genetic engineering and production of modified fatty acids by the non-conventional oleaginous yeast *Trichosporon oleaginosus* ATCC 20509. *Green Chemistry*, *18*(7), 2037-2046.

- Hudeckova, H., Neureiter, M., Obruca, S., Frühauf, S., & Marova, I. (2018). Biotechnological conversion of spent coffee grounds into lactic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 66(4), 306-312.
- ICO, 2024. <https://www.icocoffee.org/documents/cy2023-24/cmr-0724-e.pdf>
- Janissen, B., & Huynh, T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resources, Conservation & Recycling*, 128, 110-117
- Jin, M., Slininger, P. J., Dien, B. S., Waghmode, S., Moser, B. R., Orjuela, A., Costa Sousa, L., & Balan, V. (2015). Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in Biotechnology*, 33(1), 43-54.
- Kondamudi, N., Mohapatra, S. K., & Misra, M. (2008). Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11757-11760.
- Kookos, I. (2018). Technoeconomic and environmental assessment of a process for biodiesel production from spent coffee grounds (SCGs). *Resources, Conservation & Recycling*, 134, 156-164
- Kourmentza, C., Economou, Ch. N., Tsafrafidou, P., & Kornaros, M. (2018). Spent coffee grounds make much more than waste: Exploring recent advances and future exploitation strategies for the valorization of an emerging food waste stream. *Journal of Cleaner Production*, 172, 980-992.
- Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Garcia, I. L., Kookos, I. K., Papanikolaou, S., Kwan, T. H., & Lin, C. S. K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, 43(8), 2587-2627.
- Kovalcik, A., Obruca, S., & Marova, I. (2018). Valorization of spent coffee grounds: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 110, 104-119
- Kwon, E. E., Yi, H., & Jeon, Y. J. (2013). Sequential co-production of biodiesel and bioethanol with spent coffee grounds. *Bioresource Technology*, 136, 475-480.
- Lie, S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37-41.
- Lin, C. S. K., Pfaltzgraff, L. A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E. B., Abderrahim, S., Clark, J. H., Koutinas, A. A., Kopsahelis, N., Stamatelatou, K., Dickson, F., Thankappan, S., Mohamed, Z., Brocklesby, R., & Luque, R. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*, 6(2), 426-464.
- Liu, X., Wang, X., Xu, J., Xia, J., Lv, J., Zhang, T., Wu, Z., Deng, Y., & He, J. (2015). Citric acid production by *Yarrowia Lipolytica* SWJ-1b using corn steep liquor as a source of organic nitrogen and vitamins. *Industrial Crops and Products*, 78, 154-160.
- López-Barrera, D. M., Vázquez-Sánchez, K., Loarca-Piña, M. G. F., & Campos-Vega, R. (2016). Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. *Food Chemistry*, 212, 282-290.
- Maina, S., Kachrimanidou, V., & Koutinas, A. (2017). A roadmap towards a circular and sustainable bioeconomy through waste valorization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 8, 18-23.

- Maka, A. O. M., Ghalut, T., & Elsaye E. (2024). The pathway towards decarbonisation and net-zero emission by 2050: The role of solar energy technology. *Green Technologies and Sustainability*, 2(3), 100107.
- Martins, F., Felgueiras, C., Smitkova, M., & Caetano, N. (2019). Analysis of Fossil Fuel Energy Consumption and Environmental Impacts in European Countries. *Energies*, 12(6), 964.
- Massaya, J., Pereira, A. P., Lamptey, B. M., Benjamin, J., & Chuck, C. J. (2019). Conceptualization of a spent coffee grounds biorefinery: A review of existing valorisation approaches. *Food and Bioproducts Processing*, 118, 149-166.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2018). Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. *Bioresource Technology*, 247, 1077-1084.
- Matsakas, L., Gao, Q., Jansson, S., Rova, U., Christakopoulos, P. (2017). Green conversion of municipal solid wastes into fuels and chemicals. *Electronic Journal of Biotechnology*, 26(C), 69-83.
- Meo, A., Priebe, X. L., & Weuster-Botz, D. (2017). Lipid production with *Trichosporon oleaginosus* in a membrane bioreactor using microalgae hydrolysate. *Journal of Biotechnology*, 241, 1-10.
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition – A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45-58.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., & Teixeira J. A. (2011). Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 661-672.
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52-68.
- Obruca, S., Benesova, P., Kucera, D., Petrik, S., & Marova, I. (2015). Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology*, 32(6), 569-574.
- Obruca, S., Petric, S., Benesova, P., Svoboda, Z., Eremka, L., & Marova, I. (2014). Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 5883-5890.
- Panusa, A., Zuurro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., & Petrucci, R. (2013). Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4162-4168.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1031-1051.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1052-1073
- Patel, A., Matsakas, L. (2018). A comparative study on *de novo* and *ex novo* lipid fermentation by oleaginous yeast using glucose and sonicated waste cooking oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52, 364-374.
- Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as source of lipids. In *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids* (pp. 235-291). Springer.

- Ratledge, C. (2013). Microbial oils: an introductory overview of current status and future prospects. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 20(6), D602.
- Ratledge, C., & Tan, K. H. (1990). Oils and fats: production, degradation and utilization by yeasts. *Yeast biotechnology and biocatalysis*, 223-254.
- Rial, R. C. (2024). Biofuels versus climate change: Exploring potentials and challenges in the energy transition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 196, 114369.
- Saladini, F., Patrizi, N., Pulselli, F. M., Marchettini, N., & Bastianoni, S. (2016). Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 221-227.
- Sheldon, R. A. (2011). Utilisation of biomass for sustainable fuels and chemicals: Molecules, methods and metrics. *Catalysis Today*, 167(1), 3-13.
- Tai, M., & Stephanopoulos, G. (2013). Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia Lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*, 15, 1-9.
- Uddin, M. N., Techato, K., Rasul, M. G., Hassan, N. M. S., & Mofijur, M. (2019). Waste coffee oil: A promising source for biodiesel production. *Energy Procedia*, 160, 677-682.
- Vardon, D. R., Moser, B. R., Zheng, W., Witkin, K., Evangelista, R. L., Strathmann, T. J., Rajagopalan, K., & Sharma, B. K. (2013). Complete utilization of spent coffee grounds To produce Biodiesel, Bio-oil, and Biochar. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(10), 1286-1294.
- Wade, L. G (2013). Οργανική Χημεία, 7<sup>η</sup> έκδοση. Εκδόσεις Τζόλα.
- Xu, J., Du, W., Zhao, X., Zhang, G., & Liu, D. (2013). Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 7(1), 65-77.
- Yaashikaa, P. R., Kumar, P. S., Saravanan, A., Varjani, S., & Ramamurthy, R. (2020). Bioconversion of municipal solid waste into bio-based products: A review on valorisation and sustainable approach for circular bioeconomy. *Science of the Total Environment*, 748, 141321.
- Yu, X., Zheng, Y., Xiong, X., & Chen, S. (2014). Co-utilization of glucose, xylose and cellobiose by the oleaginous yeast *Cryptococcus Curvatus*. *Biomass and Energy*, 71, 340-349.
- Zheng, Y., Chi, Z., Ahring, B. K., & Chen, S. (2012). Oleaginous yeast *Cryptococcus Curvatus* for biofuel production: Ammonia's effect. *Biomass and Bioenergy*, 37, 114-124.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K., & Daum, G. (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Biomembranes*, 1469(2), 101-120.