

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ

Πανεπιστήμιο Αιγαίου, σχολή περιβάλλοντος,
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και διατροφής

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών (ΠΜΣ) «Διατροφή, Ευζωία και δημόσια υγεία

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα *trichosporon coremifforme* EXF 8679 για την παραγωγή μικροβιακού λίπους»

Μαργιούλα Δέσποινα



Μύρινα, Λήμνος, Ιούλιος 2021

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Τριμελής επιτροπή

1. Δρ. Δημήτρης Σαρρής- Επιβλέπων καθηγητής (Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Λήμνος)
2. Δρ. Κωνσταντίνος Γκατζιώνης- Συν επιβλέπων καθηγητής (Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Λήμνος)
3. Δρ. Ζαχαρία Ιωάννου- Συν επιβλέπων καθηγητής (Επίκουρος Καθηγητής Μηχανικής Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Λήμνος)

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω για την πολύτιμη βοήθεια και συνεισφορά για την πραγματοποίηση αυτής της διπλωματικής εργασίας κάποια άτομα που συμβάλαν προς αυτό. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Σαρρή Δημήτρη, επιβλέπων καθηγητή για την καθοδήγηση και την συμβουλευτική καθόλη την διάρκεια της διπλωματικής μελέτης. Επίσης, τον Δρ. Γκατζιώνη Κωνσταντίνο και τον Δρ. Ζαχαρία Ιωάννου για την προσφορά τους καθόλη την διάρκεια της εργασίας για τον ενεργό ρόλο τους και την καθοδήγηση τους. Παράληψη θα ήταν να μην ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Φυσικοχημικής επεξεργασίας υποπροϊόντων τροφίμων κ. Κιουρανάκη Γεώργιο για την επίβλεψη, το προσωπικό της μονάδας διατροφής καθώς και την υπόλοιπη ομάδα του εργαστηρίου: κα. Κοθρή μαρία, κα. Κουκουμάκη Δανάη, κ. Πιλαφίδη Σωτήρη και την κα. Έρη Τσούκο.

Αφιερώσεις

Αυτή η εργασία είναι αφιερωμένη στην οικογένεια μου που με στηρίζει στις επαγγελματικές και προσωπικές μου επιλογές εδώ και πολλά χρόνια: στον πατέρα μου Αθανάσιο Μαργιούλα, την μητέρα μου Σκάρογλου Ελισάβετ, τον αδελφό μου Χρήστο Μαργιούλα, την γιαγιά μου Σκάρογλου Μάρω και τον σύζυγο μου Γιώργο Κιουρανάκη.

Σύντομο Βιογραφικό

Σιαλμά 12, Μύρινα Λήμνου, Ελλάδα

Τηλ: +306987703037

Email: fns20017@fns.aegean.gr

ΕΡΓΑΣΙΑ

Υπεύθυνη υποδοχής- Ενοικιαζόμενα δωμάτια «Αμυγδαλιές», Μύρινα Λήμνου (Ιουλιος 2020 – Σήμερα)

- Προετοιμασία για άνοιγμα και κλείσιμο της μονάδας πριν και μετά την σεζόν
- Διεκπεραίωση άριστης υπηρεσίας και επιθεώρηση υγειονομικών προτύπων
- Ημερήσια αναφορά δωματίων
- Επίβλεψη check in, check out των πελατών

Προϊστάμενη κουζίνας-Wahaca-Λονδίνο

(Μάιος 2016 – Ιανουάριος 2020)

- Επίβλεψη προσωπικού μέχρι και 25 υπαλλήλων

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

- Διεκπεραίωση άριστης υπηρεσίας και επιθεώρηση υγειονομικών προτύπων
- Διατήρηση stock και κόστους
- Πρόγραμμα υπαλλήλων
- Απασχόληση ως μαγείρισσα σε όλα τα τμήματα του εστιατορίου
- Ημερήσια και εβδομαδιαία αναφορά κουζίνας
- Προσωπική εκπαίδευση υπαλλήλων

Προϊστάμενη κουζίνας – Lobster and Burger-Λονδίνο (Νοέμβριος 2015 – Μάιος 2016)

- Επίβλεψη προσωπικού μέχρι και 7 υπαλλήλων
- Επιθεώρηση και επίβλεψη καθαριότητας
- Πρόγραμμα υπαλλήλων

Υπεύθυνη Βάρδιας – Ζαχαροπλαστεία Τζήκας (Οκτώβριος 2014 – Σεπτέμβριος 2015)

- Επίβλεψη και επιθεώρηση καθαριότητας
- Ανανέωση και διατήρηση βιτρίνας ζαχαροπλαστείου
- Καθημερινές παραγγελίες και κοστολόγιο
- Εξυπηρέτηση πελατών

Βοηθός Αναλύσεων εργαστηρίου- Bio Lab, Θεσσαλονίκη (Ιανουάριος 2014 – Αύγουστος 2014)

- Διατήρηση προτύπων μικροβιολογικού και χημικού εργαστηρίου
- Ανάλυση δειγμάτων τροφίμων, νερού και χώματος

Πρακτική άσκηση Q-lab, Θεσσαλονίκη (Απρίλιος 2013 – Οκτώβριος 2013)

- Ανάλυση δειγμάτων τροφίμων
- Διατήρηση προτύπων χημικού εργαστηρίου
- Εργασία σε εύρος τεχνικών όπως PCR, μέτρηση λιπιδίων και χρωματομετρία

Βοηθός Φωτογράφου, Θεσσαλονίκη (Δεκέμβριος 2009- Σεπτέμβριος 2010)

- Λήψη φωτογραφίας σε δεξιώσεις, βαφτίσια και γάμους

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- ΒΑ Τεχνολογία τροφίμων και Διατροφής, προπτυχιακές σπουδές, Καρδίτσα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Διατριβή: "Η ζυθοποιία στην Ελλάδα, παρόν και μέλλον. Μελέτη περίπτωσης βιομηχανίας".
- Πιστοποιημένη διαχειρίστρια τροφίμων (HACCP) επίπεδο 3 από το αγγλικό κράτος

ΛΟΙΠΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

- Άριστη γνώση της αγγλικής γλώσσας σε όλα τα επίπεδα
- Βασική γνώση ισπανικής γλώσσας
- Συμμετοχή και παρακολούθηση σεμιναρίων με θέμα την οργάνωση μονάδων επεξεργασίας τροφίμων
- Άνετη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών
- 2η πανελλήνια ομαδική διάκριση Ξιφασκίας 2008

ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

- Παρέχεται αν ζητηθεί

Πρόλογος

Σήμερα, τα περιβαλλοντικά προβλήματα είναι πλέον ορατά όσο κάθε άλλο και η αξιοποίηση αποβλήτων από τις εγκαταστάσεις παραγωγής τροφίμων, την γεωργία, την κτηνοτροφία, την αλιεία αλλά και γενικότερα τον τομέα του πρωτογενή τομέα των τροφίμων χαρακτηρίζεται αναγκαία. Τα απόβλητα πρέπει να αντιμετωπιστούν ως πρώτη ύλη πλέον, για την παραγωγή νέων μορφών ενέργειας και νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Οι τρόποι επεξεργασίας των αποβλήτων είναι τρεις και χωρίζονται με μηχανολογικά, χημικά ή βιολογικά μέσα. Προϋπόθεση αρχικά είναι η βαθιά κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών που λαμβάνουν δράση κατά την διάρκεια της επεξεργασίας. Οι διεργασίες αυτές απαιτούν υψηλό διαθέσιμο κεφάλαιο για τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας καθώς και την εκπαίδευση των εργαζομένων. Ένα από αυτό το εύρος των αποβλήτων είναι ο κασίγαρος, το οποίο είναι το υγρό απόβλητο μετά από την παραλαβή του ελαιόλαδου κατά την διάρκεια της ελαιοπαραγωγής. Η ελιά αποτελεί το σύμβολο ειρήνης, γνώσης, σοφίας, υγείας, δύναμης και ομορφιάς. Συνδυάστηκε με τον αρχαίο Ελληνικό πολιτισμό εδώ και χιλιάδες χρόνια καθώς συνδέεται με θρύλους, παραδόσεις και θρησκευτικές τελετουργίες. Η ελιά είναι μεταξύ των παλαιότερων γνωστών καλλιεργειών στον κόσμο. Αξιοσημείωτο είναι ότι για κάθε λίτρο παραλαμβανόμενου ελαιόλαδου κατά την διάρκεια της ελαιοκομίας η παραγωγή κασίγαρου ανέρχεται στα 4 λίτρα, τα οποία είναι υψηλά τοξικά υγρών αποβλήτων λόγω του μεγάλου φαινολικού φορτίου που περιέχουν καθώς και πλήθος λιπαρών οξέων, που στο πλήθος των περιπτώσεων διατίθεται στο περιβάλλον χωρίς προ επεξεργασία προκαλώντας σημαντικά τοξικά προβλήματα. Αυτή η μεγάλη παραλαβή υγρών αποβλήτων ελαιουργίας γεννάει από μόνη της, την ανάγκη επεξεργασίας και αξιοποίησης τους.

Περίληψη

Η διατροφή, ευζωία και δημόσια υγεία σήμερα είναι ένας τομέας που χρίζεται ιδιαίτερης προσοχής καθώς ο αυξανόμενος τοξικός τρόπος ζωής είναι στην καθημερινότητα του ανθρώπου και η ανάπτυξη αυτής της επιστήμης είναι απαραίτητη για την διατήρηση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου. Τα υγρά απόβλητα ελαιουργίας τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί ως ένα εξαιρετικό υπόστρωμα για την παραγωγή νέων μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας με την χρήση μικροοργανισμών καθώς αποτελούν πηγή άνθρακα, είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, άζωτο και ιχνοστοιχεία. Έτσι, όχι μόνο μπορεί να υπάρξει παραγωγή νέων πηγών ενέργειας αλλά και νέων προϊόντων μεγάλης προστιθέμενης αξίας όπως κιτρικό οξύ, ένζυμα, εδώδιμοι πολυσακχαρίτες κ.α. Τα παραγόμενα προϊόντα που μπορούν παραχθούν κάτω από ελεγμένες συνθήκες καλλιέργειας μικροοργανισμών μπορούν να βρουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς της καθημερινότητας όπως: κοσμετολογία, φαρμακευτική, παραγωγή και επεξεργασία τροφίμων, συντηρητικά τροφίμων, γεωργία, βιοκάουσιμα κ.α. Είναι απαραίτητο βέβαια να ερευνηθούν και να θεσπιστούν νέα μοντέλα επεξεργασίας και αξιοποίησης αυτών των υποστρωμάτων. Στην παρούσα μελέτη, αφού θεσπίστηκε ένα θεωρητικό πλαίσιο (ιστορία, επεξεργασία, χημική σύσταση του καρπού της ελιάς, προσδιορισμός του κασίγαρου ως απόβλητο κ.α.) στην συνέχεια, ακολουθώντας μια πειραματική διάταξη αναλύθηκε ή βιολογική επεξεργασία του κασίγαρου με την χρήση του ζυμομύκητα *Trichosporon coremiforme* EXF 8679. Αρχικά, έγινε ένα screening σε πρότυπα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, λακτόζη, γλυκερόλη) για να δούμε σε πιο υπόστρωμα ο μικροοργανισμός έχει την μεγαλύτερη % παραγωγή σε ενδοκυτταρικό λίπος και στην συνέχεια έγινε ανάλυση της παραγωγή βιομάζας, μικροβιακού λίπους, ως προς την κατανάλωση φαινολικών οξέων και των σακχάρων που περιείχε το δείγμα κασίγαρου. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων στο υπόστρωμα και σε διαφορετικές συνθήκες C/N. Σκοπός αυτών των διεργασιών ήταν ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών που αφορούσε το ισοζύγιο κατανάλωσης φαινολικών ενώσεων/ σακχάρων από τον μικροοργανισμό ως προς την παραγωγή ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους.

Abstract

Nutrition, well-being, and public health today is an area that needs special attention as increasingly toxic lifestyles are in the daily lives of humans and the development of this science is essential to maintain the quality of human life. Olive mill wastewater in recent years has been studied as an excellent substrate to produce new metabolic value-added products using microorganisms as it is a source of carbon, rich in polyphenols, nitrogen, and trace elements. Thus, not only can new energy sources be produced but also new value-added products such as citric acid, enzymes, edible polysaccharides, etc. The resulting products that can be produced under controlled conditions of cultivation of microorganisms can find application in various areas of everyday life such as: cosmetology, pharmaceuticals, food production and processing, food preservatives, agriculture, biocarbon's, etc. It is of course necessary to research and establish new models for the processing and use of these substrates. In the present study, after establishing a theoretical framework (history, processing, chemical composition of olive fruit, identification of goat fat as a waste, etc.) then, following an experimental setup, the biological treatment of goat fat using the yeast *Trichosporon coremiforme* EXF 8679 was analyzed. Initially, a screening on standard sugars (glucose, fructose, lactose, glycerol) was performed to see on which substrate the microorganism has the highest % production in intracellular fat and then the biomass production, microbial fat, was analyzed in terms of phenolic acid consumption and sugars contained in the goat meat sample. The analyses were carried out at different initial concentrations of sugars in the substrate and at different C/N conditions. The purpose of these processes was to determine the optimal conditions concerning the phenolic compounds/sugar consumption balance by the microorganism in relation to the production of intracellular microbial oil.

Περιεχόμενα

Τριμελής επιτροπή	2
Ευχαριστίες.....	2
Αφιερώσεις.....	2
Σύντομο Βιογραφικό	2
Πρόλογος.....	4
Περίληψη.....	4
Abstract	5
Συνομογραφίες	7
Πίνακας περιεχομένων.....	8
Κατάλογος γραφμάτων/Σχεδίων.....	8
Κατάλογος πινάκων.....	8
Σκοπός της εργασίας	8
Εισαγωγή	9
Ιστορική αναδρομή	9
Χημική σύνθεση του καρπού	10
Τύποι ελαιουργείων	10
Πρώτη μορφή ελαιουργείου	10
Μυκηναϊκή εποχή.....	11

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Ρωμαϊκή αυτοκρατορία.....	11
Περιστρεφόμενοι τροχοί.....	11
Σύγχρονα ελαιοτριβεία	12
Υγρά απόβλητα ελαιουργίας.....	12
Σύνθεση των υγρών απόβλητων ελαιουργίας.....	12
Περιβαλλοντικά προβλήματα που προκύπτουν από την διάθεση των αποβλήτων ελαιουργίας.....	14
Ρυπαντική ισχύς ΥΑΕ	15
Μέθοδοι διαχείρισης υγρών αποβλήτων ελαιουργίας	16
Μηχανική επεξεργασία	16
Βιολογική επεξεργασία	16
Φυσικοχημική επεξεργασία	17
Άλλοι μέθοδοι	18
Παράγωγα προϊόντα από τα ΥΑΕ	19
Αξιοποίηση για απολύμανση νερού και λυμάτων.....	19
Βιομετατροπή.....	19
Βιοενέργεια	19
Βιοαιθανόλη	19
Βιουδρογόνο	20
Βιομεθάνιο.	20
Βιοαλκοόλες.	20
Βιομόρια- βιοπολυμερή.....	21
Παραλαβή ενζύμων.....	21
Πηκτίνες.....	21
Αντιοξειδωτικά-Φαινολικές ενώσεις.....	21
Γεωργικές εφαρμογές	22
Μικροβιακό λίπος	23
Κιτρικό οξύ.....	24
Πολυόλες.....	24
Ενδοπολυσακχαρήτες	25
Έκκριση πρωτεϊνών	25
Ζύμες	26
Μικροβιακή ανάπτυξη και θρέψη ζυμών	26
Μορφολογία μικροοργανισμού και μεταβολικά μονοπάτια- <i>Trichosporon coremiforme</i> EXF8679	27
Γενικά.....	27
Ταξινόμηση.....	27
Βιότοπος.....	27

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Μορφολογία.....	28
Κατανάλωση σακχάρων	28
Αναβολισμός λιπιδίων.....	29
Παραγόμενα προϊόντα.....	30
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
Πειραματική διάταξη και διαδικασία	31
Βιολογικό υλικό-Ανανέωση στελέχους	31
Υπόστρωμα προκαλλιέργειας	31
Θρεπτικό υπόστρωμα κυρίως καλλιέργειας.....	31
Πειραματικός σχεδιασμός.....	31
Αναλυτικοί μέθοδοι.....	32
Προσδιορισμός και διόρθωση pH.....	32
Προσδιορισμός βιομάζας.....	32
Προσδιορισμός του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους	32
Αποφαινελοποίηση	33
Αποχρωματισμός.....	33
Προσδιορισμός ελεύθερων σακχάρων (ενδοπολυσακχαρίτες)	33
Προσδιορισμός ελεύθερων αμινοσμάδων (FAN)	33
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
Αποχρωματισμός- Αποφαινελοποίηση.....	37
Φωτογραφικό υλικό	38
Διαγράμματα	39
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	44
ΠΕΡΕΤΑΙΡΩ ΕΡΕΥΝΑ.....	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

Συντομογραφίες

1. C/N= Λόγος άνθρακα προς άζωτο
2. Υ.Α.Ε.= Υγρά απόβλητα ελαιουργίας
3. BOD₅= Βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο
4. COD₅= Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο
5. ΑΠΕ= Ανανεώσιμες πηγές ενέργεια
6. GRAS= Generally referred as safe
7. ΑΜΤ= Μονοφωσφορική αδενοσίνη
8. ΑΤΡ= Τριφωσφορική αδενοσίνη
9. KH₂PO₄= Δισόξινο φωσφορικό Κάλιο
10. NaHPO₄= Φωσφορικό δινάτριο
11. MgSO₄ = Θεϊκό μαγνήσιο
12. MnSO₄= Δισθενές θεϊκό μαγγάνιο
13. ZnSO₄= Θεϊκός ψευδάργυρος
14. FeCl₃= Χλωριούχος σίδηρος
15. CaCl₂= Χλωριούχο ασβέστιο

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Πίνακας περιεχομένων

Κατάλογος γραφισμάτων/Σχεδίων

1. Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε γλυκόζη C/N=60 (σελ. 39)
2. Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε γλυκόζη C/N=120 (σελ. 39)
3. Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασίγαρου με την προσθήκη σακχάρων προσομοίωσης υποστρώματος κασίγαρου (80% γλυκόζη, 20% φρουκτόζη) C/N=120 (σελ. 40)
4. Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασίγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=60) (σελ. 40)
5. Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασίγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=120) (σελ. 41)
6. Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασίγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=200) (σελ. 41)
7. Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασίγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=300) (σελ. 42)
8. Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασίγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=400) (σελ. 42))
9. Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασίγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=200), 50% αραίωση (σελ. 43)

Κατάλογος πινάκων

1. Βασικά συστατικά των επιμέρους τμημάτων του καρπού του ελαιοκάρπου (σελ.10)
2. Κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ΥΑΕ (σελ. 13)
3. Κύρια συστατικά των ΥΑΕ (σελ. 14)
4. Screening σε πρότυπα σάκχαρα (σελ. 31)
5. Screening σε κασίγαρο (σελ. 32)
6. Table 3: C/N=60 glycose equivalents (σελ. 34)
7. Table 3: C/N=60 fructose equivalents (σελ. 34)
8. Table 2: C/N=120 glycose equivalents (σελ. 34)
9. Table 4 C/N= 120 fructose equivalentants (σελ. 35)
10. Table 5: Glycerol and Lactose results (σελ. 35)
11. Table 6: C/N=120 80% glycose & 20% fructose (σελ. 35)
12. Table 7: C/N= 120 fructose (σελ. 35)
13. Table 8: C/N= 200 fructose (σελ. 36)
14. Table 9: C/N= 300 fructose (σελ. 36)
15. Table 10: C/N= 400 fructose (σελ. 36)
16. Table 11: C/N=200 fructose equivalents (50% reduction) (σελ. 37)
17. Table: Phenol and colour reduction on OMW samples (σελ. 37)

Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της εργασίας είναι να διερευνήσει την ικανότητα βιοτροποποίησης του κασίγαρου από τον ζυμομύκητα *Trichosporon coremiforme* EXF-9679 ως προς την παραγωγή μικροβιακού λίπους με την ταυτόχρονη μείωση φαινολικού φορτίου/αποχρωματισμός. Το μικροβιακό λίπος που παράγουν κάποια στελέχη ζυμομυκήτων, μεταξύ άλλων έλαιων περιέχουν και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία αποτελούν έλαια τα οποία δεν μπορεί να συνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός, είναι απαραίτητα για την βιολογική

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

ανάπτυξη/διατήρηση του οργανισμού και πρέπει να τα λάβει μέσω της τροφής. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητο να αναπτυχθεί επιστημονική γνώση για την ικανότητα των ζυμομυκήτων να παράγουν μικροβιακά έλαια, η οποία θα αποτελέσει την βάση για την ανάπτυξη τεχνολογιών παραγωγής μικροβιακού ελαίου σε βιομηχανική κλίμακα (εφαρμογή στην φαρμακολογία).

Εισαγωγή

Ιστορική αναδρομή

Η χρησιμοποίηση της ελιάς κοντά σε αρχαίους ναούς στην Αττική και στην Κρήτη συμβολίζει ότι κατά την αρχαιότητα προσδιόριζε ένα σύμβολο θεότητας. Υπάρχουν δυο παραδοχές από που άντλησε η ελιά το όνομα της. Η μια συνδέεται με την ελληνική μυθολογία, όπου κατά αυτήν, η θεά Αθηνά κέρδισε τον θεό Ποσειδώνα όταν εκείνη πρόσφερε στον λαό της Αθήνας μια ελιά ενώ εκείνος μια μικρή λίμνη με αλμυρό νερό. Η δεύτερη ιστορία συνδέεται με την Παλαιά διαθήκη κατά την οποία στον «κατακλυσμό του Νόε», όταν εκείνος απελευθέρωσε ένα περιστέρι (στο τέλος του κατακλυσμού), αυτό επέστρεψε με ένα φύλλο ελιάς στο ράμφος του. Αυτό σηματοδοτούσε ότι τα νερά υποχώρησαν και ότι επήλθε ειρήνη μεταξύ Θεού και ανθρώπου. Όμως, ακόμα πολλοί μύθοι και παραμύθια συνδέονται με το δέντρο της ελιάς όπως το ρόπαλο του Ηρακλή, το κρεβάτι του Οδυσσέα (που ήταν φτιαγμένα από ξύλο ελιάς) κ.α. (Μπλικά 2009) Στην αρχαία Ελλάδα το ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκε για φαρμακευτικούς και θρησκευτικούς λόγους αλλά και ως καλλυντικό. Οι αρχαίοι Έλληνες μετέφεραν την καλλιέργεια της ελιάς στις αποικίες τους στα παράλια της σημερινής Ισπανίας και της Ιταλίας (de Graaff and Errink, 1999). Η ελιά καλλιεργήθηκε πιο συστηματικά τον 7^ο και 8^ο αιώνα π.Χ. (Fiorino and Nizzi Griffi, 1992). Μια από τις πιο διαδεδομένες και αξιομνημόνευτες χρήσης του δέντρου της ελιάς είναι κατά τους Ολυμπιακούς αγώνες όπου ένα στεφάνι ελιάς ήταν το έπαθλο του νικητή (Μπλικά, 2008). Οι Ρωμαίοι γνώρισαν την ελιά και το ελαιόλαδο μέσω των επαφών τους με τις ελληνικές αποικίες στην Ιταλία και ενώ δεν ήταν θαυμαστές της, την διέδωσαν σε όλη τους την αυτοκρατορία (Boskou, 1996). Αρχικά οι Ρωμαίοι θεωρούσαν το ελαιόλαδο ως προϊόν μέτριας ποιότητας και το χρησιμοποιούσαν σαν καύσιμη ύλη στα λουτρά τους (Fiorino and Nizzi Griffi, 1992). Ο Ρωμαίος γεωπόνος αναγνώρισε την αξία του και το αποκάλεσε «Βασίλισσα των δέντρων» (Frankel et al. 1994). Με την κατάκτηση της Ελλάδας, της Μικράς Ασίας και της Αιγύπτου από την ρωμαϊκή αυτοκρατορία, αυξήθηκε η εμπορική δραστηριότητα στην Μεσόγειο του ελαιόλαδου όχι μόνον σαν τρόφιμο αλλά και ως πηγή φαρμακευτικών ειδών και ενέργειας. (Chazau-Gillig, 1994). Τον 15^ο αιώνα μ.Χ. οι ιεραπόστολοι μετέφεραν το δέντρο της ελιάς στην Αμερική. Εκεί, η ελιά καλλιεργήθηκε μόνον σε περιορισμένες περιοχές, στην Χιλή, Αργεντινή και την Καλιφόρνια. (Kapellakis et al., 2007). Σήμερα υπάρχουν 750-850 εκατομμύρια παραγωγικές ελιές στον πλανήτη και λαμβάνουν χώρα σε μια έκταση, επιφάνειας 7-8,5 εκατομμύρια εκτάρια (Molina Alcaide and Nefzaoui, 1996; Niaounakis and Halvadakis, 2006). Πέρα από την βρώση, σήμερα η ελιά εξακολουθεί να χρησιμοποιείται για την παραγωγή φαρμάκων και καλλυντικών. Ακόμα, οι ελιές και το ελαιόλαδο είναι η βάση της Μεσογειακής διατροφής που δίνει στον άνθρωπο μακροζωία. Ο πιο σημαντικός παράγοντας στην σωστή παραγωγή της ελιάς είναι οι συνθήκες κατά τις οποίες παράγεται.

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»



Εικόνα 1: Το ελαιόλαδο και οι ελιές βασικό αγαθό της «μεσογειακής διατροφής»

Χημική σύνθεση του καρπού

Ο ελαιόκαρπος βοτανικά ονομάζεται δρύπη και αποτελείται από 3 μέρη: το επικάρπιο, το μεσοκάρπιο ή σάρκα και το ενδοκάρπιο. Το μεσοκάρπιο είναι το σημαντικότερο τμήμα του καρπού και αποτελεί το 70-80% του βάρους του. Τα κυριότερα συστατικά του καρπού της ελιάς είναι το νερό, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, ζάχαρα, φυτικές ίνες και φαινολικές ενώσεις. (Υπουργείο Γεωργίας) Ο καρπός της ελιάς περιέχει ένα κουκούτσι το οποίο αποτελείται από 30% λιπίδια, 20% υδατάνθρακες και 50% νερό. (Μπλίκα 2009)

Πίνακας 1: Βασικά συστατικά των επιμέρους τμημάτων του ελαιοκάρπου

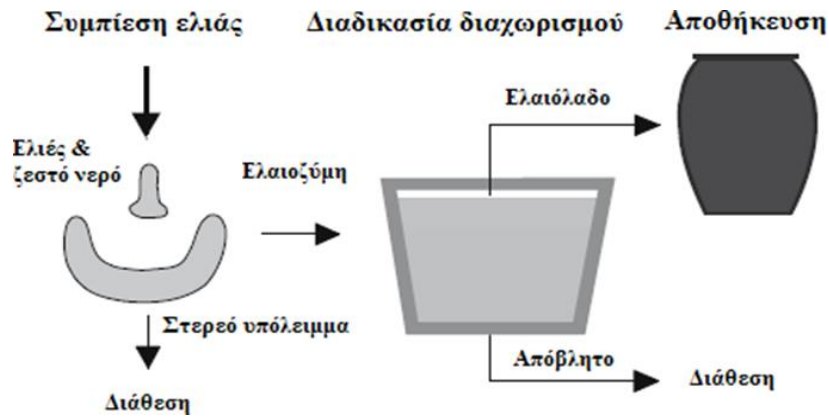
Συστατικά	Μεσοκάρπιο (%)	Κουκούτσι (%)	Πυρήνας (%)
Νερό	50 - 60	9,3	30
Λάδι	15 - 30	0,7	27,3
Αζωτούχες ενώσεις	2 - 5	3,4	10,2
Σάκχαρα	3 - 7,5	41	26,6
Κυτταρίνη	3 - 6	38	1,9
Μέταλλα	1 - 2	4,1	1,5
Πολυφαινόλες	2 - 2,25	0,1	0,5 - 1
Άλλα	-	3,4	24

Τύποι ελαιουργείων

Πρώτη μορφή ελαιουργείου

Κατά την εξέλιξη της ανθρωπότητας, διάφορες τεχνικές παραγωγές του ελαιόλαδου αναπτύχθηκαν και εξελιχθήκαν. Η πρώτη αναφορά σε τεχνικές παραγωγής ελαιόλαδου γίνονται το 5.000 π.Χ., όπου ο άνθρωπος χρησιμοποιούσε μεγάλες πέτρες (Di Giocacchino, 2000) και κατά την χρήση αυτής της διαδικασίας, δυο κυκλικές πέτρες (γουδόπετρες) περιστρεφόταν χειροκίνητα, ο καρπός έσπαγε και η ελαιοζύμη κυλούσε μέσω μιας εξόδου που υπήρχε στην τομή των πετρών και συλλεγόταν. Στην συνέχεια με την χρήση ζεστού νερού, γινόταν συλλογή μέσω διαχωρισμού των δύο φάσεων ως προς το βάρος τους (Melena, 1983). Η αποθήκευση γινόταν σε πήλινα δοχεία. (Davaras, 1976, Ψιλάκης et al., 2003).

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»



Εικόνα 2: Η διαδικασία παραγωγής ελαιόλαδου κατά τη διάρκεια της περιόδου του Χαλκού Μυκηναϊκή εποχή

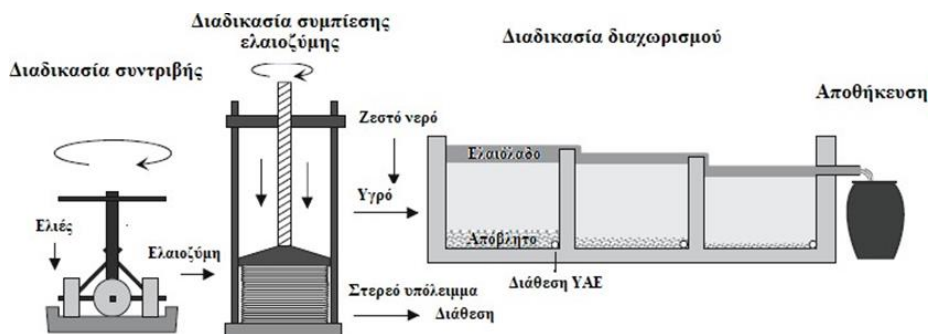
Μετάπειτα, κατά την διάρκεια της Μυκηναϊκής εποχής (1450-1150 π.Χ.), η διαδικασία παραγωγής ήταν σχεδόν ίδια με την περίοδο του χαλκού. Αναφορές έχουν γίνει ότι υφάσματα χρησιμοποιούνταν από τους Αιγύπτιους (Αλεξάκης, 2003) κατά το στάδιο του φιλτραρίσματος της ελαιοζύμης για την μεγαλύτερη απόδοση (Ψιλάκης et al., 2003). Τα υφάσματα περιστρεφόταν, έχοντας μέσα τους την ελαιοζύμη και με την πίεση που δημιουργούνταν το ελαιόλαδο διαχωριζόταν. (Faure, 1976; Isager and Skydsgaard, 1995).

Ρωμαϊκή αυτοκρατορία

Η κατανάλωση και η παραγωγή του ελαιόλαδου μεγάλωνε και οι Ρωμαίοι έπρεπε να εξελίξουν το σύστημα παραγωγής για να ανταπεξέλθουν στην αυξημένη παραγωγή. Αυτό επιτεύχθηκε με την προσθήκη περιστρεφόμενων μυλόπετρών και την προσθήκη πιεστηρίου για την βελτιστοποίηση του διαχωρισμού της ελαιοζύμης (Κιουρελλίς, 2005).

Περιστρεφόμενοι τροχοί

Μέχρι τρεις αιώνες πριν η παραγωγή του ελαιόλαδου ήταν μια δύσκολη διαδικασία γιατί απαιτούσε μεγάλη σωματική προσπάθεια. Αυτό, βελτιώθηκε με την χρήση περιστρεφόμενων τροχών που κινούνταν από ζώα (άλογα ή αγελάδες) (Corra-Zuccari, 1962) (Ψιλάκης et al., 1999). Στην ελαιοζύμη κατά αυτήν την περίοδο προστεθήκαν νερό όπως και κατά την Ρωμαϊκή αυτοκρατορία και έπειτα οδηγούνταν σε διαφράγματα ελαιόλαδου λεγόμενα και ως «μποξάδες». Αυτά τα διαφράγματα λειτουργούσαν ως φίλτρα από το οποίο λαμβανόταν μίγμα ελαιόλαδου/νερού. Έπειτα το μίγμα ελαιόλαδου/νερού οδηγούνταν σε πέτρινες δεξαμενές όπου εκεί το ελαιόλαδο διαχωριζόταν στο πάνω μέρος. (Μπλίκια 2009) Ο Joseph Graham το 1795 εφεύρε το υδραυλικό πιεστήριο, το οποίο όμως εντάχθηκε στο σύστημα παραγωγής τον 20^ο αιώνα όπου αναπτύχθηκαν οι τεχνολογικές μέθοδοι και καινοτομίες (Μπαλατσούρας, 1986) (Σηφουνάκης, 1994).

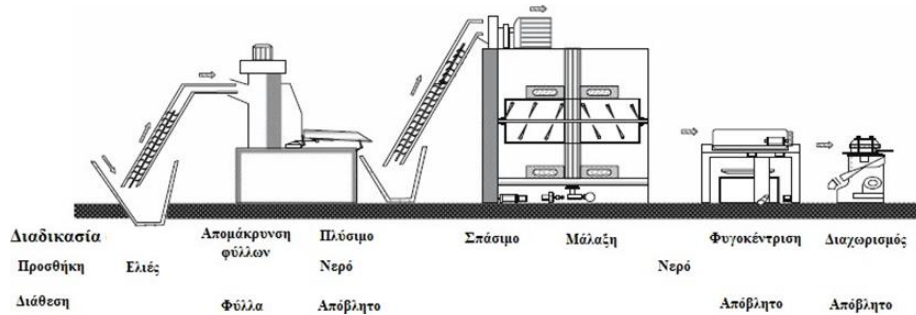


Εικόνα 3: Η διαδικασία παραγωγής ελαιόλαδου κατά τον 20^ο αιώνα

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Σύγχρονα ελαιοτριβεία

Σήμερα χρησιμοποιείται κατά βάση το σύστημα φυγοκέντρωσης για τον διαχωρισμό νερού-ελαιόλαδου-στερεών με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας ελαιόλαδου και καλύτερης ποιότητας. (Μπλίκια, 2009) Χρησιμοποιείται το πιεστήριο τριών ή δυο φάσεων και σε λίγα ελαιοτριβεία εφαρμόζεται η παραδοσιακή μέθοδος με υδραυλικό πιεστήριο.



Εικόνα 4: Η διαδικασία παραγωγής ελαιόλαδου σήμερα

Υγρά απόβλητα ελαιουργίας

Το κύριο προϊόν που σχετίζεται με την επεξεργασία του ελαιόκαρπου είναι το ελαιόλαδο. Τα δευτερεύοντα παράγωγα προϊόντα όταν δεν βρίσκουν κάποια χρήση ονομάζονται απόβλητα, ενώ όταν περιέχουν χρήσιμα συστατικά και αποτελούν βάση για επεξεργασία με σκοπό την παραγωγή άλλων προϊόντων ονομάζονται υποπροϊόντα ή παραπροϊόντα. Θεωρούνται τα πιο απαιτητικά και τα πιο δύσκολα σε επεξεργασία απόβλητα από τις αγροτικές διεργασίες. Η παγκόσμια παραγωγή ΥΑΕ είναι περίπου $3 \times 10^7 \text{ m}^3$ (Sayadi and Ellouz, 1995; Benitez et al., 1997; Mantzavinou and Kalogerakis, 2005; Massadeh and Modallal, 2008). Στην Ελλάδα η παραγωγή των αποβλήτων ανέρχεται στα $1.5 \times 10^6 \text{ m}^3$ (Tsioupras et al., 2002). Στην ελαιουργία τα υγρά παραπροϊόντα που στην μορφή που τα παραλαμβάνουμε δεν έχουν καμία εμπορική χρήση ονομάζονται λόζυμα απόνερα ή κασιγάρος. Αυτά τα υγρά όμως είναι πλούσια σε συστατικά όπως σάκχαρα, πρωτεΐνες, φαινολικές ουσίες, χρωστικές και χλωροφύλλες. Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου (ΥΑΕ) είναι παράγωγα του τριφασικού συστήματος επεξεργασίας και προέρχονται από το κλάσμα του χυμού του ελαιόκαρπου με το νερό που προστίθεται στην πλύση του καρπού, την μάλαξη, την φυγοκέντρωση και κατά τον διαχωρισμό του ελαιόλαδου. Σε όλον τον κόσμο παρουσιάζεται διαφορετική ορολογία για τον προσδιορισμό των υγρών αποβλήτων.

Σύνθεση των υγρών απόβλητων ελαιουργίας

Η σύνθεση, τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των ΥΑΕ επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως η ποικιλία της ελιάς, οι κλιματολογικές συνθήκες, το στάδιο ωρίμανσης, την κατάσταση θρέψης (Cabregra et al., 1996), το σύστημα συλλογής του καρπού αλλά ο σημαντικότερος παράγοντας είναι η τεχνική επεξεργασίας όπου οι διαφορές μεταξύ των τεχνικών είναι μεγάλες. Η κύρια οργανική σύνθεση των υγρών αποβλήτων ελαιουργίας αποτελείται από σάκχαρα, κυτταρίνη, πυκτίνη, φαινολικές ενώσεις, φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, πολυαλκοόλες, αμινοξέα, πρωτεΐνες, οργανικά οξέα και υπολειμματικά έλαια. (Σαρρής, 2009). Τα ανόργανα συστατικά των ΥΑΕ όπως το Κάλιο, ο Φώσφορος, το Μαγνήσιο καθώς και πολλά ιχνοστοιχεία παρουσιάζουν ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης λιπαντικής τους αξίας. Στα φαινολικά που έχουν ανιχνευτεί θα πρέπει να προστεθούν πολυμερείς ουσίες καστανό μαύρου χρώματος που δεσμεύονται δευτερογενώς μέσω ενζυμικών αντιδράσεων που αρχίζουν μετά την έκθλιψη του

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Παράμετρος	Όρια τιμών
Νερό %	83-94
Οργανικά συστατικά %	4-16
Ανόργανα συστατικά %	1-2
Πυκνότητα (g/cm ³)	1,024
Αγωγιμότητα (μS/cm)	80.000-160.000
pH	4,5-6,5
Βιολογικά απαιτούμενα οξυγόνο (BOD5) mg/L	14.000-110.0000
Χημικά απαιτούμενα οξυγόνο (COD) mg/L	41.400-130.000

ελαιοκάρπου (Saiz,1986) Στα ΥΑΕ έχουν ανιχνευτεί πάνω από 30 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. Σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος παρατηρούνται δυο βασικές κατηγορίες. (Tsagaraki et al., 2006).

- 1) Φαινολικά μονομερή, φλαβονοειδή, μη αυτοξειδούμενες ταννίνες και άλλες ενώσεις με μοριακό βάρος κάτω των 10kDa.
- 2) Μεσαίου και μεγάλου μοριακού βάρους (πάνω από 10 kDa) σκουρόχρωμα πολυμερή, τα οποία προέρχονται από πολυμερισμό και αυτοξείδωση των φαινολικών ενώσεων της πρώτης ομάδας.

Πίνακας 2: Κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ΥΑΕ (Fiestas Ros de Ursinos and Borja-Padilla, 1992; Hamdi and Ellouz, 1992).

Το χρώμα των ΥΑΕ εξαρτάται από την αναλογία των δυο αυτών ομάδων. Ανάλογα με την χημική τους σύσταση χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- 1) Παράγωγα του κινναμικού οξέος (κινναμικό οξύ, ο-, π- κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ).
- 2) Παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (βενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ).
- 3) Παράγωγα της β-3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλης όπως τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη.

Οι οργανικές ουσίες των ΥΑΕ μπορούν να διαχωριστούν σε ενώσεις άμεσα διασπώμενες (όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα), βιοαποδομήσιμα πολυμερή (πρωτεΐνες, ημικυταρρίνες) και δύσκολα διασπώμενα συστατικά όπως μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες και φαινολικές ενώσεις (Οιχαλιώτης και Ζερβάκης, 1999). Τα εκχυλίσματα από ΥΑΕ διαθέτουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση και θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια φτηνή πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών. Οι πιο κοινοί είναι βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ή μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να μετασχηματίζουν δύσκολα διασπώμενα συστατικά όπως μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες και φαινολικά συστατικά. Επίσης υπάρχουν ζύμες του γένους *Saccharomyces*, μύκητες *Penicillium* και *Aspegillus*. Μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί από καρπούς ελιάς είναι στελέχη μυκήτων και βακτηρίων από τα γένη *Aerobacter*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Fusarium* (Fiestas Ros de Ursinos and Borja-Padilla, 1992; Oikonomou et al., 1994).

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Πίνακας 3: Κύρια συστατικά των ΥΑΕ (Zervakis and Balis, 1996).

Παράμετρος	Σύστημα πίεσης	Σύστημα 3 φάσεων
ρΗ	5.27	5.23
Ξηρή ύλη (g L ⁻¹)	129.7	61.1
Ειδικό βάρος	1.049	1.020
Ελαιόλαδο (g L ⁻¹)	2.26	5.78
Ανάγωγα σάκχαρα (g L ⁻¹)	35.8	15.9
Φαινόλες (g L ⁻¹)	6.2	2.7
Αλκοόλη (g L ⁻¹)	6.2	2.7
Βιομάζα (g L ⁻¹)	20	6.4
COD (g O ₂ L ⁻¹)	146.0	85.7
Οργανικό άζωτο (mg L ⁻¹)	544	404
Φώσφορος (mg L ⁻¹)	485	185
Νάτριο (mg L ⁻¹)	110	36
Κάλιο (mg L ⁻¹)	2470	950
Ασβέστιο (mg L ⁻¹)	162	69
Μαγνήσιο (mg L ⁻¹)	194	90
Σίδηρος (mg L ⁻¹)	32.9	14.0
Χαλκός (mg L ⁻¹)	3.12	1.59
Ψευδάργυρος (mg L ⁻¹)	3.57	2.06
Μαγγάνιο (mg L ⁻¹)	5.32	1.55
Νικέλιο (mg L ⁻¹)	0.78	0.57
Κοβάλτιο (mg L ⁻¹)	0.43	0.18

Περιβαλλοντικά προβλήματα που προκύπτουν από την διάθεση των αποβλήτων ελαιουργίας

Τα ΥΑΕ αποτελούν ιδιαίτερα αγροτοβιομηχανικά τοξικά απόβλητα από άποψη ρυπαντικού φορτίου. Από ένα τόνο καρπού ελιάς παράγονται 200 κιλά ελαιόλαδο, 400-1200 κιλά υγρά απόβλητα, 400-800 στερεά απόβλητα και για αυτό το λόγο, γίνεται αντιληπτό ότι η διαδικασία παραλαβής του ελαιόλαδου είναι από τις πιο ρυπογόνες διαδικασίες που δημιουργούν περιβαλλοντικά προβλήματα. Αυτά τα προβλήματα

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

δημιουργούνται κυρίως από τα υγρά απόβλητα. Τα υγρά απόβλητα ακόμα και σήμερα σε πολλές περιπτώσεις εκχύνονται σε κοντινούς υδάτινους δέκτες όπως ποτάμια, λίμνες και θάλασσες. Αυτό προκαλεί την καταστροφή του υδάτινου δέκτη καθώς είναι πολύ τοξικό απόβλητο και την γενικότερη υποβάθμιση του περιβάλλοντος της γύρω περιοχής για αυτόν τον λόγο. Αυτό γίνεται κυρίως από την έλλειψη οξυγόνου το οποίο καταναλώνεται από κάποιες ομάδες μικροοργανισμών που βρίσκονται στα απόβλητα για την οξείδωση των οργανικών ουσιών. Πρέπει να σημειωθεί ότι για πολλά χρόνια η νομοθεσία ήταν ελλιπής όσο αναφορά τα στερεά απόβλητα βιομηχανιών γενικά αλλά και της ελαιουργίας ειδικότερα. Από το 1986 τέθηκε σε εφαρμογή η οδηγία της Ευρωπαϊκής ένωσης (74/442/Ε.Ε., 15-6-1975), η οποία προβλέπει ότι τα κράτη μέλη πρέπει να ακολουθούν συγκεκριμένα πρότυπα για την διαχείριση των αποβλήτων. (Λυμπεράτος, 2000_α). Σε συνέχεια της εφαρμογής του νόμου αυτού στην Ελλάδα άρχισαν να λειτουργούν πυρινοελαιουργεία τα οποία αποτελούν λύση στο πρόβλημα. Παρόλο την θέσπιση της νομοθεσίας ακόμα και σήμερα παρατηρείται σε όλη την Ευρώπη απουσία ολοκληρωμένων συστημάτων επεξεργασίας αποβλήτων για λόγους μείωσης του κόστους της παραγωγής του ελαιόλαδου (κατασκευαστικό και λειτουργικό) και την εξασφάλιση της βιωσιμότητας της σχετικής επένδυσης. Αυτές οι ενέργειες όμως δεν μπορούν να εγγυηθούν την αποτελεσματική επεξεργασία του ελαιοκάβρου. Σε κάθε περίπτωση η διαχείριση των αποβλήτων ελαιουργίας θα πρέπει να γίνονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να διασφαλίζεται η δημόσια υγεία. Θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα για την προστασία των νερών, του αέρα, του εδάφους, της χλωρίδας, της πανίδας, του τοπίου γύρω από τις περιοχές που παρουσιάζουν οικολογικό, πολιτιστικό και αισθητικό ενδιαφέρον και δεν θα πρέπει να υπάρχουν προβλήματα οσμών ή θορύβους. Βάση αυτού, σήμερα στην χώρα μας γίνονται πολλές ενέργειες ως προς αυτήν την κατεύθυνση από περιοχές που παρουσιάζουν τέτοια προβλήματα.

Ρυπαντική ισχύς ΥΑΕ

Η απόρριψη των ΥΑΕ στο έδαφος χωρίς έλεγχο οδηγούν στην δημιουργία ανεπιθύμητων οσμών, ανάπτυξη πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών και ίσως ανεπιθύμητων αλκοολικών ζυμώσεων.. Η απομάκρυνση σε πηγάδια, λίμνες ή και θάλασσες, επηρεάζει τα φυσικά χαρακτηριστικά του εδάφους καθώς επίσης και την χημική του σύσταση. Όταν τα ΥΑΕ απορρίπτονται χωρίς καμία επεξεργασία κοντά σε υδάτινες περιοχές, υπάρχουν μεγάλες επιπτώσεις σε αυτές. Το πιο ορατό αποτέλεσμα ρύπανσης είναι ο αποχρωματισμός του ύδατος που είναι αποτέλεσμα οξείδωσης και του πολυμερισμού των ταννίνων οι οποίες έχουν σαν παράγωγα σκουρόχρωμες πολυφαινόλες οι οποίες είναι δύσκολο να απομακρυνθούν. (Σαρρής, 2009) Επίσης, για την αποικοδόμηση των σακχάρων (π.χ. γλυκόζη) των ΥΑΕ χρησιμοποιούνται μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών που βρίσκονται στο έδαφος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την κατανάλωση της συγκέντρωσης του διαθέσιμου διαλυτού οξυγόνου στο νερό το οποίο οδηγεί στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των φυτών και όλων των ζωντανών μικροοργανισμών. Ακόμα, τα λιπίδια που βρίσκονται στα ΥΑΕ μπορούν να ανεβούν στην επιφάνεια των υγρών αλλά και του εδάφους και να δημιουργήσουν ένα παχύ αδιαπέραστο στρώμα. Αυτό το στρώμα λίπους μπορεί να παρεμποδίσει την διαπέραση του ηλίου με αποτέλεσμα την μη ανάπτυξη φυτών μέσα και έξω από το νερό και αυτό οδηγεί σε ξηρασία. Η μεγάλη περιεκτικότητα σε φώσφορο μπορεί να οδηγήσει και αυτή σε ξηρασία και βοηθάει στην ανάπτυξη φυκιών με αποτέλεσμα την καταστροφή του οικοσυστήματος ή την μη ομαλή διεξαγωγή του. Η μεγάλη περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά των ΥΑΕ μπορεί να αποτελέσει ένα τέλειο υπόστρωμα για παθογόνους μικροοργανισμούς που μπορούν να αναπτυχθούν σε αυτό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την προσβολή της θαλάσσιας ζωής και των ανθρώπων που έρχονται σε επαφή με το μολυσμένο νερό. Τέλος, εάν η απόρριψη των ΥΑΕ γίνεται με μεγάλους μεταλλικούς σωλήνες (πιο κοινή μέθοδος σήμερα) παρατηρείται γρήγορη διάβρωση τους λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε οργανικά οξέα. Στην περιοχή κοντά που απορρίπτονται τα ΥΑΕ παρατηρούνται έντονες χαρακτηριστικές οσμές. Αυτές, οφείλονται σε πτητικά οργανικά οξέα και άλλες οργανικές ουσίες. Όταν τα ΥΑΕ αποθηκεύονται σε ανοικτές λιμνοθάλασσες ή απορρίπτονται στην στεριά, παρατηρούνται φαινόμενα ζύμωσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεθανίου και άλλα έντονα αέρια που οδηγούν σε έντονες ρυπογόνες οσμές. (Σαρρής, 2009)

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Μέθοδοι διαχείρισης υγρών αποβλήτων ελαιουργίας

Τα ΥΑΕ έχουν έναν διπλό ρόλο. Αυτός είναι ότι αποτελούν μια πηγή για ανάκτηση χρήσιμων προϊόντων και ένα απόβλητο για διαχείριση, το οποίο τα καθιστά πολύ ενδιαφέρον από περιβαλλοντικής άποψης. Χημικοί, μηχανικοί, φυσικοί, βιολογικοί, θερμικοί μέθοδοι ή συνδυασμός αυτών εφαρμόζονται από διάφορες ερευνητικές ομάδες με σκοπό την εύρεση αποδοτικών και οικονομικών εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισης. Κάποιοι φυσικοχημικοί, χημικοί, βιολογικοί (αερόβιες ή αναερόβιες) μέθοδοι διαχείριση αυτών των αποβλήτων έχουν αποτελέσματα. Μερικά από τα παραγόμενα προϊόντα είναι η ανακύκλωση του νερού μέσα στο απόβλητο και το στερεό υπόλειμμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν στερεό λίπασμα είτε απευθείας είτε μετά από κομματοποίηση είτε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ακατέργαστο υλικό για την παραγωγή αντιοξειδωτικών. Αυτά τα απόβλητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης σαν καύσιμη ύλη, ακατέργαστα είτε μετά από επεξεργασία σαν βιοντίζελ.

Μηχανική επεξεργασία

Διήθηση (Filtration): Η μέθοδος της διήθησης αποτελεί μια από τις πιο παλιές μεθόδους για την απομάκρυνση των στερεών από τα υγρά απόβλητα. Η μέθοδος βασίζεται στο φιλτράρισμα του υγρού από πορώδες υλικό το οποίο συγκρατεί τα στερεά και επιτρέπει την διέλευση της υγρής φάσης. (Israilides et al., 1996).

Επίπλευση (Flotation): Η επίπλευση είναι μια μηχανική μέθοδος διαχωρισμού των αιωρούμενων στερεών από τα υγρά απόβλητα κατά την οποία με την χρήση ενός αερίου στο σύστημα (όπως αέρα ή άζωτο) διευκολύνεται ο διαχωρισμός.

Καθίζηση: Η καθίζηση είναι μια μέθοδος που έχει σαν βασική αρχή την βαρύτητα. Τα μόρια με μεγαλύτερη πυκνότητα από αυτή του νερού απομακρύνονται από την υδάτινη φάση. Έτσι, απομακρύνεται περίπου το 50% των διαλυμένων στερεών και 35% του BOD₅. Το υλικό που καθίζεται, συλλέγεται και οδηγείται για περαιτέρω επεξεργασία.

Απολίπωση: Πριν την επεξεργασία των ΥΑΕ αφαιρείται η λιπαρή φάση με την χρήση παγίδων λιπών διότι εμποδίζουν την ομαλή επεξεργασία των ΥΑΕ στο βιολογικό σύστημα επεξεργασίας. Όσο μεγαλύτερα είναι τα ελαιοσταγονίδια, τόσο μεγαλύτερη είναι η τάση τους να σχηματίζουν ένα φιλμ ελαίου στην επιφάνεια του νερού. Για την απομάκρυνση αυτού χρησιμοποιούνται ειδικές συσκευές, οι απολιπωτές, το έλαιο προσκολλάει στην υδρόφιλη φάση και στην συνέχεια απομακρύνεται.

Φυγοκέντριση: Κατά την μέθοδο αυτήν, τα απόβλητα που υποβάλλονται σε φυγοκέντριση σχηματίζουν τρεις διαχωρισμένες φάσεις:

- Επιφανειακό στρώμα που περιέχει έλαιο.
- Υδάτινο στρώμα με τα διαλυτά υλικά.
- Στρώμα ιζήματος που συγκεντρώνει αιωρούμενα κολλοειδή (Σαρρής, 2013)

Βιολογική επεξεργασία

Λίμνες εξάτμισης: Οι λίμνες εξάτμισης αποτελούν μια από τις παλαιότερες μεθόδους για την επεξεργασία των ΥΑΕ. Είναι μια τεχνική, ικανοποιητική για την επεξεργασία των ΥΑΕ με μικρό ρυπαντικό φορτίο. Οι βιολογικοί μέθοδοι επεξεργασίας βασίζονται στην δράση μικροοργανισμών που ανοικοδομούν οργανικά συστατικά των αποβλήτων, σε απλούστερα, αβλαβή και ενεργειακά σταθερότερα προϊόντα (Μπλίκια, 2007).

Μέθοδος ενεργού ηλίου: Αυτού του είδους οι εγκαταστάσεις άρχισαν να χρησιμοποιούνται γύρω στο 1930 και κύριος σκοπός ήταν η απομάκρυνση των μη διαλυτών στερεών (όπως άμμος και περιττώματα). Τα

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

διαλυμένα συστατικά (οργανικές ενώσεις, άζωτο, φώσφορος) απορρίπτονταν σε ποτάμια με αποτέλεσμα να δημιουργούν συνθήκες ευτροφισμού στους υδάτινους αποδέκτες λόγω της τοξικότητά τους.

Αναερόβια επεξεργασία: Η αναερόβια επεξεργασία αποτελεί μια πολύ χρήσιμη μέθοδο για την απομάκρυνση του οργανικού φορτίου από πολύ μολυσμένα υγρά απόβλητα. Κατά την αναερόβια επεξεργασία χρησιμοποιούνται βακτήρια που δεν χρειάζονται οξυγόνο για την αποικοδόμηση οργανικών ενώσεων από τα υγρά απόβλητα. Σαν παράγωγο της μεθόδου είναι η σημαντική ποσότητα μεθανίου το οποίο είναι σημαντική πηγή ενέργειας και μικρή παραγωγή λάσπης.

Αραίωση: Ένας από τους πιο απλούς τρόπους για την μείωση του οργανικού φορτίου στα ελαιοτριβεία είναι η μέθοδος της αραίωσης με την χρήση φυσικών μέσων. Το νερό που χρησιμοποιείται, βρίσκεται σε αφθονία στην φύση κατά την διάρκεια της χειμερινής περιόδου σε κοντινά ρεύματα, ρυάκια, πηγάδια ή μέσω άρδευσης. Η αραίωση έχει σκοπό την μείωση της συγκέντρωσης του αποβλήτου (Νιαουνάκης και Χαλβαδάκης, 2006).

Φυσικοχημική επεξεργασία

Για την βελτιστοποίηση της επεξεργασίας των ΥΑΕ πρέπει να γίνει η κατάλληλη προ επεξεργασία με μεθόδους όπως η διήθηση, συσσωμάτωση και το φιλτράρισμα. Είναι σημαντικό να επιλεγεί ο καλύτερος χημικός παράγοντας για συσσωμάτωση το οποίο θα οδηγήσει στην αποβολή σημαντικών ποσοστών κολλοειδών σωματιδίων από τα υγρά απόβλητα (τα οποία θα αφαιρεθούν στην συνέχεια με φίλτρο άμμου). Τέλος, γίνεται διήθηση με την χρήση μεμβρανών η οποία εξασφαλίζει μείωση του οργανικού φορτίου κατά 95%.

Διαχωρισμός με μεμβράνες: Αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται για την απομάκρυνση αιωρούμενων συστατικών, κολλοειδών και διαλυμένων ουσιών από τα υγρά απόβλητα. Κατά την μέθοδο αυτή, χρησιμοποιείται μια ημιπερατή ή πορώδη μεμβράνη, η οποία λειτουργεί σαν φράγμα, η οποία συγκρατεί ουσίες (ανάλογα με το μέγεθος τους) οι οποίες περνάνε μέσα από αυτήν. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την διαπερατότητα είναι το μέγεθος των μορίων και το μέγεθος των πόρων των μεμβρανών.

Τα συστήματα διαχωρισμού με μεμβράνες είναι:

- Στερεά από αέρια
- Στερεά από υγρά
- Αέρια από αέρια
- Αέρια από υγρά
- Υγρά από υγρά
- Διαλυμένα ή κολλοειδή υλικά από υγρά

Αποτέφρωση: Ως αποτέφρωση ορίζεται η καταστροφή του οργανικού περιεχομένου των αποβλήτων με την παρουσία αέρα, σε υψηλή θερμοκρασία. Κατά την διαδικασία έχουμε την πλήρη εξάτμιση του ύδατος. Αυτή η μέθοδος είναι αποτελεσματική λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των ΥΑΕ σε οργανική ουσία. Όσο υψηλότερο είναι το οργανικό φορτίο των ΥΑ τόσο πιο αποτελεσματική είναι η τεχνολογία αποτέφρωσης σε σύγκριση με την μηχανική/βιολογική επεξεργασία.

Εξάτμιση και απόσταξη: Κατά την διάρκεια αυτής της μεθόδου επεξεργασίας, το οργανικό και ανόργανο περιεχόμενο των ΥΑΕ και οι μη-πτητικές διαλυμένες ουσίες (που εξατμίζονται), συμπυκνώνονται. Η εξάτμιση γίνεται με θερμότητα παραγόμενη από καύση ή με φυσικό τρόπο (ήλιος). Το μειονέκτημα των διαδικασιών

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

αυτών σχετίζονται με την επεξεργασία και την διάθεση των προϊόντων που προκύπτουν. Αυτά τα υπολείμματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή αλλά η χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω ότι έχουν πικρή γεύση και μεγάλη περιεκτικότητα σε κάλιο (Rozzi et al., 1996). Ακόμα, αυτά τα υπολείμματα έχουν υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο τα οποία χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Το εξατμιζόμενο νερό μπορεί να συμπυκνωθεί και επαναχρησιμοποιείται στην μονάδα μεταποίησης. Η αποδοτικότητα της εξάτμισης υπολογίζεται στο 50% των ολικών διαλυμένων στερεών. Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει από την εξάτμιση μπορεί να καεί και παράγεται θερμική ενέργεια στις εγκαταστάσεις του εργοστασίου.

Συσσωμάτωση: Η συσσωμάτωση είναι η χημική αποσταθεροποίηση των κολλοειδών διασπορών λόγω της προσθήκης κατάλληλων ηλεκτρολυτών, οι οποίοι μειώνουν το φορτίο των κολλοειδών σωματιδίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση των ηλεκτροστατικών απωστικών δυνάμεων και τα κολλοειδή τεμάχια σχηματίζουν μεγαλύτερα συσσωματώματα τα οποία καθιζάνουν σαν ίζημα. Η διαδικασία αυτή δεν είναι πολύ αποδοτική στα ΥΑΕ. (Rozzi et al., 1996).

Καθίζηση: Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των διαλυμένων ουσιών από τα ΥΑΕ. Κατά την μέθοδο, προστίθεται ένας χημικός παράγοντας που επιτρέπει την συσσωμάτωση σωματιδίων, παρεμποδίζοντας τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις που τα κρατούν χωριστά. (Μπλίκια, 2007). Η μέθοδος της καθίζησης βασίζεται στην απομάκρυνση του ρυπαντικού φορτίου από τα ΥΑΕ υπό μορφή στερεού ιζήματος. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ χρήσιμη στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων. (Brenes et al., 1993).

Οξειδωση/αναγωγή και αποτοξικοποίηση: Ένα μεγάλο μέρος των συστατικών των ΥΑΕ (και των τοξικών ουσιών), μπορεί να καταστραφεί ή να αποτοξινωθεί μέσω οξειδαναγωγικών αντιδράσεων. Κατά την διάρκεια της χημικής οξειδωσης, οξειδωτικά μέσα χρησιμοποιούνται όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ή χλώριο για να μειωθεί το COD, το BOD5 και την απομάκρυνση του οργανικού/ οξειδωμένου οργανικού ρυπαντικού φορτίου. Η μέθοδος αυτή δεν χρησιμοποιείται συχνά για την επεξεργασία ΥΑΕ, λόγω του μεγάλου όγκου οξειδωτικών μέσων που χρειάζονται για την επεξεργασία του οργανικού φορτίου των αποβλήτων.

Προσρόφηση: Ως προσρόφηση ορίζεται η φυσική σύνδεση αερίων ή διαλυμένων ουσιών στην επιφάνεια των στερεών, κυρίως ως πορώδη στερεά. Ως παράγοντας προσρόφησης χρησιμοποιείται κυρίως ο ενεργός άνθρακας. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την: εξάλειψη οσμών, χρώματος και γεύσης, ανάκτηση διαλυτών, καθαρισμός υγρών αποβλήτων, απομάκρυνση τοξικών ουσιών από τα απόβλητα (φυτοφάρμακα, φαινόλες κ.α.)

Εξουδετέρωση: Η τεχνική αυτή, χρησιμοποιείται σαν διαδικασία προεπεξεργασίας και έχει σκοπό την απομάκρυνση της αιωρούμενης/κολλοειδούς ύλης των αποβλήτων. Αυτό, επιτυγχάνεται με την αποκατάσταση τις ισορροπίας ιόντων υδρογόνου ή υδροξυλίου στο διάλυμα. (Σαρρής,2013)

Άλλοι μέθοδοι

Άλλοι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η αποτοξικοποίηση και ο καθαρισμός οι οποίοι έχουν βρεθεί ότι ελέγχουν την μερική ή ολική επεξεργασία των ΥΑΕ. Κατά την ανάπτυξη της μαγιάς *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 σε ΥΑΕ με σκοπό την επεξεργασία τους, βρέθηκε ότι η επίδραση της μαγιάς μείωσε το COD κατά 80% την πρώτη ημέρα, την βιομάζα κατά 22,45 g/L και την παραγωγή του ενζύμου λίπανσης σε αντιδραστήρα ζύμωσης. Επίσης απομακρύνθηκαν λίπη/έλαια, φαινόλες και υδατάνθρακες. Κατά την διάρκεια ενός άλλου πειράματος ελέγχθηκε η ενζυματική απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους και η επίδραση της καθαρής μικροβιακής δράσης μεταξύ πολυφαινολών-οξυδάσεων. Τα δύο ενζυματικά

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

συστήματα είχαν παρόμοια αποτελέσματα όσο αναφορά την δραστικότητα σε σχέση με τον πολυμερισμό των φαινολών. Η μέθοδος αυτή θεωρείται χαμηλού κόστους. (Μπλίκια, 2007)

Παράγωγα προϊόντα από τα ΥΑΕ

Αξιοποίηση για απολύμανση νερού και λυμάτων

Τα απόβλητα ελαιουργίας έχουν υψηλή ικανότητα προσρόφησης, μεγάλη δηλαδή ικανότητα να δεσμεύουν ή να ελκύουν μόρια ή ιόντα από μια επιφάνεια. (Dermerch et.al. 2013) Αυτήν την ικανότητα αξιοποιούν οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό νερού και λυμάτων. Όσο αναφορά τα λύματα, μελέτες έδειξαν ότι η εφαρμογή ελαιοζύμης σε λύματα που περιείχαν την δραστική βαφή υφασμάτων είχε ως αποτέλεσμα την επίτευξη υψηλών τιμών προσρόφησης χρωστικών (Parageorgiou, 2017). Έρευνες έχουν καταλύξει στο συμπέρασμα ότι η ελαιοζύμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως ως βιοπροσροφυτικό υγρό για την κατεργασία λυμάτων. Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι το γεγονός πως δεν απαιτείται κάποια προκατεργασία (Akar et. Al. 2009). Αρκετές έρευνες έχουν δείξει πως τα απόβλητα ελαιουργίας και τα προϊόντα τους είναι κατάλληλα για την εφαρμογή δέσμευσης βαρέων μετάλλων από υδατικά διαλύματα. Ο ενεργός άνθρακας από εκχυλίσματα ελαιοζύμης και του ελαιοπυρίνα, αναφέρεται ότι απομακρύνει αποτελεσματικά ιόντα τρισθενούς αρσενικού ($As^{(III)}$), δισθενούς καδμίου $Cd^{(II)}$ (Aziz, 2015), αργυλίου (Ghazy, 2006), τρισθενούς $Cr (III)$ και εξασθενούς χρωμίου $Cr (VI)$ από υδατικά διαλύματα (Budínona, 2006) και δισθενούς μόλυβδου $Pb (II)$ (Martin-Lara 2012)

Βιομετατροπή

Βιοενέργεια

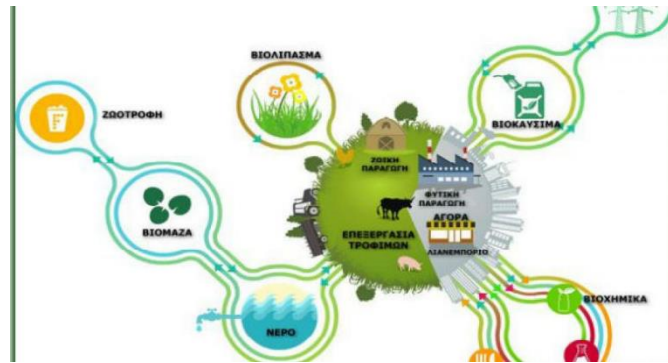
Η βιοενέργεια αποτελεί μια μορφή ανανεώσιμων πηγών ενέργειας (ΑΠΕ) που προέρχεται από την ενεργειακή αξιοποίηση οργανικών υλικών βιολογικής προέλευσης. Τα οργανικά αυτά υλικά ονομάζονται σε ένα γενικό ορισμό βιομάζα και αποτελούν την πρώτη ύλη που μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης έχουν μετατρέψει την ηλιακή ενέργεια που έχουν λάβει μέσω της ακτινοβολίας σε χημική. Το καύσιμο που παράγεται από την κατάλληλη επεξεργασία της βιομάζας ονομάζεται βιοκαύσιμο. Άρα, βιομάζα είναι η πρώτη ύλη, βιοκαύσιμο είναι το καύσιμο στο οποίο μετατρέπεται η βιομάζα και βιοενέργεια η ηλεκτρική/θερμική/κινητική ενέργεια η οποία παράγει.

Βιοαιθανόλη

Η βιοαιθανόλη (γνωστή και ως βιοντίζελ) αποτελεί υγρό καύσιμο και είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή για την αποκατάσταση του πετρελαίου. Αποτελεί μια πιο οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον επιλογή και φιλοδοξεί να αλλάξει τα δεδομένα στον κλάδο της ενέργειας. Ως βιοντίζελ ορίζεται κάθε φυτικό έλαιο ή ζωικό λίπος που έχει ή μπορεί να αποκτήσει (μέσω επεξεργασίας) συγκρίσιμες ιδιότητες ως καύσιμο με το ντίζελ και για αυτόν τον λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικής προέλευσης υποκατάστατο του. Το βιοντίζελ τυπικά παράγεται μετά από χημική αντίδραση λιπιδίων από διάφορα φυτικά έλαια, όπως το σογιέλαιο, ή ζωικά λίπη, όπως ξύγκι με μια αλκοόλη (αντίδραση εστεροποίησης). Το βιοντίζελ χρησιμοποιείται σε κανονικούς κινητήρες ντίζελ ενώ τα φυτικά και απόβλητα έλαια χρησιμοποιούνται ως καύσιμα σε κινητήρες ντίζελ οι οποίοι έχουν υποστεί κατάλληλη μετατροπή. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο ντίζελ μόνο του αλλά και σε μίγματα με πετροντίζελ, σε οποιοσδήποτε αναλογία αλλά και ως πετρέλαιο θέρμανσης. Παράγεται μέσω της αλκοολικής ζύμωσης όταν ζυμομύκητες καλλιεργούνται σε υγρά υποστρώματα και καταναλώνουν ζάχαρα παράγοντας αιθανόλη. Στην Ελλάδα η αγορά των «πράσινων» καυσίμων δεν είναι τόσο ανεπτυγμένη και το υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας θέσπισε την υποχρεωτική ανάμειξη βιοκαυσίμων στα μείγματα βενζίνης σταδιακά ως λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα. Από τον Ιανουάριο του

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

2019 η βενζίνη που διακινείται στην Ελλάδα περιέχει τουλάχιστον 1% βιοαιθανόλη, ενώ το 2020 το ποσοστό προσαρμόστηκε στο 3,3%. Στις ΗΠΑ έχει υιοθετηθεί το μείγμα βενζίνης E10, δηλαδή βενζίνη με πρόσμιξη βιοαιθανόλης 10% ενώ υπάρχει και για ειδικά οχήματα αντίστοιχο καύσιμο με 85% περιεκτικότητα βιοαιθανόλης με την ονομασία E85. (Υπουργείο περιβάλλοντος και ενέργειας)(Dermeche, 2013).



Εικόνα 5: Κυκλική οικονομία βιώσιμης ανάπτυξης

Βιοδρογόνο

Βιουδρογόνο ονομάζεται το υδρογόνο που παράγεται με βιολογικές μεθόδους. Η παραγωγή του από μικροοργανισμούς έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον παγκοσμίως εξαιτίας των προοπτικών του ως μια ανεξάντλητη, φθηνή και ανανεώσιμη πηγή ενέργειας. Έχει σαν χαρακτηριστικό την χαμηλή ανάγκη εκπομπής CO₂ στο συνολικό κύκλο ζωής τους (προέλευση, παραγωγή, χρήση και διανομή) σε σχέση με τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα. (Bioenergy and environmental cluster, 2019). Η παραγωγή βιοδρογόνου μπορεί να γίνει με παρουσία ή απουσία φωτός, για την χρήση τους ως πηγή ενέργειας.

Βιομεθάνιο.

Το βιομεθάνιο ή ανανεώσιμο φυσικό αέριο παράγεται μέσω της αναβάθμισης αερίου. Η παραγωγή βιοαερίου σχηματίζεται από το αποτέλεσμα αναερόβιας πέψης μετά από καλλιέργεια διαφόρων μυκήτων ή βακτηρίων σε διάφορα υποστρώματα. Η σύνθεση του αερίου είναι μεταξύ 50-75% μεθανίου και το υπόλοιπο CO₂ με μικρές ποσότητες υδρατμών, αζώτου, οξυγόνου και υδρόθειου. Οι διεργασίες που έχουν προταθεί για την παραγωγή βιομεθανίου από τα ΥΑΕ περιλαμβάνουν αναερόβιες-αερόβιες προ κατεργασίες δύο σταδίων και αναερόβια χώνευση δύο φάσεων (Dermeche et.al. 2013, Hamdi, 1992). Ιδιαίτερα αποτελεσματικοί μύκητας που έχουν καλλιεργηθεί σε ΥΑΕ είναι ο *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* και *Candida tropicalis*. (Martinez-Garcia 2009)

Βιοαλκοόλες.

Η υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ύλη των ΥΑΕ, τα καθιστά μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης, με την χρήση ζυμών και βακτηρίων. Οι πολυσακχαρίτες που περιέχονται στα απόβλητα ελαιουργίας μετατρέπονται σε βιοαιθανόλη μέσω διεργασιών που περιλαμβάνουν δυο στάδια.

A) Στο **πρώτο** στάδιο τα ανάγονται σάκχαρα απελευθερώνονται μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης είτε με εφαρμογή φυσικοχημικών μεθόδων προκατεργασίας των αποβλήτων.

B) Στο **δεύτερο** στάδιο, τα ανάγονται σάκχαρα μετατρέπονται σε βιοαιθανόλη από τους ζυμομύκητες /βακτήρια που χρησιμοποιούνται (Dermeche et. Al. 2013)

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Ωστόσο μελέτες (Bambalou G et. Al. 1989) έδειξαν ότι η ποσότητα της αιθανόλης που παράγεται είναι πολύ μικρή σε σχέση με τις ανάγκες παραγωγής του, του μικρού ποσού των σακχάρων των υγρών αποβλήτων, της τοξικότητας του υποστρώματος και της χαμηλής συγκέντρωσης αλκοόλης στο υγρό της ζύμωσης, με αποτέλεσμα η μέθοδος να μην χαρακτηρίζεται ως οικονομική.

Βιομόρια- βιοπολυμερή

Τα ΥΑΕ αποτελούν ένα οικονομικό υπόστρωμα για την παραγωγή ξανθάνης. Η ξανθάνη, είναι ένας εξωκυτταρικός ετεροπολυσακχαρίτης που παράγεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* και είναι ο πιο εμπορικά αποδεκτός μικροβιακός πολυσακχαρίτης. Χρησιμοποιείται ευρέως σαν πηκτική ουσία σε φαγητά, καλλυντικά, φαρμακευτικά, χαρτί, μπογιά, υφάσματα κ.α. Τα ΥΑΕ αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για την παραγωγή ξανθάνης, λόγω της υψηλής αναλογίας C/N και των σακχάρων σε αυτά. Επίσης, τα ΥΑΕ περιέχουν οργανικά οξέα και άλλα συστατικά όπως υδατάνθρακες και φαινολικά τα οποία αποτελούν πηγή άνθρακα για την παραγωγή πολυμερών. (Ντόλια, 2006) Μελέτες προγραμμάτων της Ε.Ε. (Ε.Υ. QLK5-2000-00766 BIOLIVE) ασχολούνται με την παραγωγή πολυουρεθάνης και φαινολοπλαστικών πολυμερών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα εξαντλημένο ελαιοπυρίνα ο οποίος περιέχει υψηλό περιεχόμενο σε λιγνίνη, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη.

Παραλαβή ενζύμων

Τα απόβλητα ελαιουργίας έχουν αξιοποιηθεί σε ερευνητικό επίπεδο για την παραγωγή ενζύμων που βρίσκουν χρήση σε πλήθος βιομηχανικών εφαρμογών κυρίως στον τομέα των γαλακτοκομικών και φαρμακευτικών προϊόντων αλλά και απορρυπαντικών (Dermerche, et al 2013). Έχουν αναφερθεί (Crognale et al 2006) παραλαβές των εξής ενζύμων από την επεξεργασία ΥΑΕ:

- Λιπάσης από τον μύκητα *Candida cylindracea*
- Λιπάσης από τον ζυμομύκητα *Yarrowia lipolytica* (Lanciotti et al 2005)
- Λακκάσης από τον μύκητα *Panus tigrinus*
- Μη- εξαρτώμενης υπεροξειδάσης από τον μύκητα *Panus tigrinus*
- Πηκτινασών από τον μύκητα *Cryptococcus albidus var. Albidus*

Στελέχη των *Geotrichum candidum*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* οδήγησαν επίσης στην παραγωγή λιπασών από ΥΑΕ (D'Annibale et al 2006).

Πηκτίνες

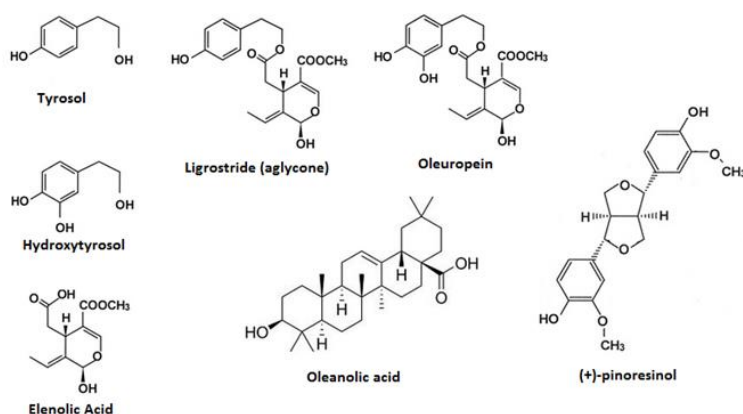
Οι πηκτίνες αποτελούν φυσικά κολλοειδή που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στην βιομηχανία τροφίμων ως γαλακτωματοποιητές, πηκτωματογόνα και σταθεροποιητές (αναφέρονται με τον κωδικό E440). Οι κυριότερες πηγές πηκτινών είναι τα μήλα και οι φλοιοί των εσπεριδοειδών (Γενικό χημείο του κράτους, 2008). Ωστόσο, στα πλαίσια αναζήτησης άλλων πηγών πηκτινών, τα ΥΑΕ διφασικού συστήματος επεξεργασίας ελιάς έχουν μελετηθεί ως χαμηλού κόστους πρώτη ύλη.

Αντιοξειδωτικά-Φαινολικές ενώσεις

Οι πολυφαινόλες είναι οι ουσίες που περιέχουν τουλάχιστον ένα βενζολικό δακτύλιο, πολικές ενώσεις με τουλάχιστον ένα υδροξύλιο, δυσδιάλυτες στα λίπη, με έντονη αντιοξειδωτική δράση. Ο όρος βιοφαινόλη προσκομίζεται στην παραγόμενη φαινόλη με βιολογικά μέσα η οποία είναι πιο φτηνή από την κοινή χημικά παραγόμενη φαινόλη. Ο ρόλος των βιοφαινολών στην καθημερινή διατροφή είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι έχουν αντιοξειδωτική δράση και περιορίζουν τις ελεύθερες ρίζες. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ισχυρές βιοφαινόλες ευθύνονται για πολλά από τα οφέλη για την υγεία που συνδέονται με την Μεσογειακή διατροφή. Βιοενεργές βιοφαινόλες προσδίδουν ένταση που συνδέεται με το πιπέρι, πικρία και άλλα

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

επιθυμητά χαρακτηριστικά γεύσης. (Κυριακού 2020) Σύμφωνα με το Σφλώμο (2011) οι πολυφαινόλες που βρίσκονται σε φυτικά προϊόντα λέγονται βιοφαινόλες. Περιέχονται κυρίως στη σάρκα του ελαιόκαρπου, και από εκεί περνούν μερικώς στο ελαιόλαδο κατά την ελαιοποίηση. (Lirakos 2017) Ανάλογα με τις καλλιεργητικές μεθόδους, τις εδαφικές και κλιματικές συνθήκες, τις τεχνικές μεταφοράς και αποθήκευσης υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές στα ποσά των πολυφαινολών του καρπού. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος φαίνεται να επιδρά θετικά στη δημιουργία πολυφαινολών στην ελιά (Boskou, 2009; Salvador et al., 2003; Gimeno et al., 2002). Έρευνες έχουν δείξει ότι τόσο τα στερεά όσο και τα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων αποτελούν μια αξιόλογη πηγή φαινολικών ενώσεων δεδομένου του χαμηλού κόστους και της μεγάλης διαθεσιμότητας που υπάρχουν από την παραγωγή τους. Οι πολυφαινόλες αυτές βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας όπως την κοσμητολογία, ποτοποιία, σίτιση κ.α.



Εικόνα 6: Χημική δομή κάποιων βιοφαινολών (Κυριακού 2020)

Γεωργικές εφαρμογές

Εδώδιμοι μύκητες

Μεταξύ άλλων εφαρμογών, τα απόβλητα ελαιουργίας αποτελούν ένα εξαιρετικά καλό υπόστρωμα για την παραλαβή εδώδιμων μυκήτων. Η χρήση κομπόστ από υγρά απόβλητα ελαιουργείου αναδείχτηκε ότι επιδρά θετικά στην παραγωγή μυκήτων του είδους *Agaricus bisporus* (Altieri et al., 2009) καθώς και καλλιέργεια μυκήτων του είδους *Pleurotus* σε υποστρώματα πεπιοσμένων στερεών αποβλήτων ελαιουργίας εμποτισμένης με υγρά απόβλητα (Zervakis et al., 1996). Στελέχη του μύκητα *Lentinula edodes* (Le119), (μανιταριού σιτάκιε), καλλιεργήθηκε απευθείας σε υγρά απόβλητα, παρουσίασε αποχρωματισμό των αποβλήτων κατά 65% και απομάκρυνση του 75% των φαινολικών ενώσεων. Έτσι, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για την παραγωγή του μανιταριού σιτάκιε, όσο και για τη μείωση του φυτοτοξικού περιεχομένου των υγρών αποβλήτων ελαιωτριβείων (Parageorgiou, 2017).

Παραγωγή οργανικών λιπασμάτων

Για να χρησιμοποιηθούν τα υγρά απόβλητα ελαιουργίας σε γεωργικές εφαρμογές, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η επεξεργασία, διότι εάν εφαρμοστούν κατευθείαν στο έδαφος επηρεάζουν δυσμενώς την ανάπτυξη των φυτών, την δράση των μικροοργανισμών ενώ επηρεάζουν αρνητικά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους. (Aharopon, 2017) Η κύρια αιτία των φαινομένων της φυτοτοξικότητας που προκαλείται από την απευθείας διάθεση ΥΑΕ στο έδαφος οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις και έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζουν την φυτρωτικότητα των σπερμάτων (Dermeche et al 2013) Όμως, εάν απομακρυνθούν επιτυχώς οι φαινολικές ενώσεις, η υψηλή συγκέντρωση νερού, η πηγή οργανικής ύλης και τα θρεπτικά συστατικά (για τα φυτά) που περιέχονται στα ΥΑΕ, τα καθιστούν πολύ υποσχόμενη πρώτη ύλη για την δημιουργία λιπασμάτων και εδαφοβελτιωτικών.

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Εφαρμογή ως παρασιτοκτόνα

Μια από τις εφαρμογές που έχουν προταθεί για την αξιοποίηση αποβλήτων ελαιοτριβείων είναι και η χρήση τους ως προϊόντα με φυτοπροστατευτική δράση (Carrasso et al. 1995). Φαινολικά κλάσματα που παραλήφθηκαν από ΥΑΕ της ποικιλίας Mission και Frantio (Obied et al., 2007) βρέθηκαν να παρουσιάζουν ευρέος φάσματος αντιβακτηριδιακή δράση έναντι στελεχών των *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Επίσης, τα φαινολικά κλάσματα των υγρών αποβλήτων των δύο ποικιλιών παρουσίασαν και αξιόλογη κοχλιολεϊμακοκτόνα δράση έναντι του *Isidorella newcombi*. Ακόμα, συμπυκνωμένα υγρά αποβλήτων ελαιοτριβείων πλούσια σε υδροξυτυροσόλη βρέθηκε ότι, όταν εφαρμοστούν σε σπόρους τομάτας και πεπονιού, είχαν ικανοποιητική απολυμαντική δράση έναντι των *Fusarium sambucinum*, *Verticillium dahliae* και *Alternaria solani*, ενώ παράλληλα, ενισχύουν την ευρωστία των σποριόφυτων (Yangui et al., 2009).

Ζωοτροφές

Τα απόβλητα διφασικών συστημάτων ελαιουργίας έχουν προταθεί να χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή (Alcaide and Nefzaoui 1996). Η υψηλή περιεκτικότητα τους σε δύσπεπτες διαιτητικές ίνες και η χαμηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών (ιδιαίτερα λυσίνης) καθιστά απαραίτητο τον εμπλουτισμό τους σε πρωτεϊνικά συμπληρώματα (Alcaide et al. 2003). Έρευνες (Brozzoli et al. 2010) έχουν μελετήσει την επίδραση της κατεργασίας με μύκητες των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *Pleurotus pulmonarius* για την βελτίωση της θρεπτικής αξίας της ελαιοζύμης. Οι έρευνες καταλήξαν, ότι ναι μεν υπήρξε αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου (7-9%) και μείωση του φαινολικού φορτίου 50-60%, παρατηρήθηκε μέτρια απομάκρυνση των λιγνινών και σημαντική μείωση των ημικυτταρινών, γεγονός που οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι, μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου, δεν ήταν δυνατή η ταυτόχρονη βελτίωση της πεπτικότητας του ενεργειακού περιεχομένου του μίγματος ελαιοζύμης - ζωοτροφών. Γενικά, λαμβάνοντας υπόψη το κόστος των διεργασιών απομάκρυνσης των αντιθρεπτικών παραγόντων που περιέχονται στα απόβλητα των ελαιοτριβείων, η αξιοποίησή τους ως ζωοτροφή δεν αποτελεί κατά το μάλλον οικονομικά βιώσιμη επιλογή. (Parageorgiou, 2017)

Μικροβιακό λίπος

Τα λιποειδή είναι μια μεγάλη οικογένεια ενώσεων τα οποία αποτελούνται από: λιπαρά οξέα, στεροειδή, καροτενοειδή, τερπένια κ.α. Ταξινομούνται με βάση την πολικότητα (ουδέτερα και πολικά) και τη δομή τους (απλά και σύνθετα)(Κουκουμακί, 2020). Το μικροβιακό λίπος διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες οι οποίες είναι:

- a) τα ουδέτερα λιπίδια
- b) γλυκολιπίδια
- c) φωσφολιπίδια

Οι ζύμες οι οποίες μπορούν να παράγουν λίπος περισσότερο από 20% επί του βάρους τους χαρακτηρίζονται ως ελαιογόνες. Υποσχόμενα γένη ζυμών ανοίκουν: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* και *Lipomyces*. Μελετημένα είδη για την παραγωγή λίπους είναι: *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Cryptococcus curvatus* και *Lipomyces starkeyi*. Το προφίλ του λίπους το οποίο παράγεται από αυτές τις ελαιογόνες ζύμες είναι παρόμοιο αυτό από κάποια φυτικά έλαια. Έχει βρεθεί ότι το ποσοστό και η σύσταση του λίπους κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας/χρόνου δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες μεταβολές, κάτι που υποδηλώνει ότι η μεταβολή των παραπάνω συνθηκών μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικό λιπιδαιμικό προφίλ για την εκάστοτε ζύμη (Vasconcelos et al., 2019, Papanikolaou & Aggelis 2020). Έρευνες έχουν δείξει ότι, τα κύρια λιπαρά οξέα που σχηματίζονται από τη ζύμη *Y. lipolytica* είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0) και το στεατικό οξύ (C18:0). Επίσης σε υψηλά ποσοστά παράγονται το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), ελαιϊκό οξύ (C18:1) και το λινελαϊκό οξύ (C18:2) (Sarris et al., 2011, Sarris et al., 2017, Sarris et al., 2019, Tzirita et al., 2019).

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Κιτρικό οξύ

Το κιτρικό οξύ είναι ένα τρικαρβοξυλικό οξύ, που αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν του μεταβολισμού των κυττάρων. Θεωρείται μια οικονομική διαδικασία παραγωγής της μικροβιολογικής βιομηχανίας και χαρακτηρίζεται από έντονη ζήτηση. Συγκεκριμένα, η ετήσια παγκόσμια παραγωγή κιτρικού οξέος είναι 1,6 εκατομμύρια τόνους, με αύξηση 3-5%. Χρησιμοποιείται κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων (απορροφάει σχεδόν το 95% της παραγωγής) καθώς και σε χημικές, μεταλλουργικές, ιατρικές και κλωστοϋφαντουργικές βιομηχανίες. Επίσης, χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών και συνθετικών απορρυπαντικών. Παραδοσιακά, το κιτρικό οξύ παράγεται από μελάσα, με τη χρήση του μύκητα *Aspergillus niger*. Ωστόσο, η συγκεκριμένη διεργασία δεν είναι φιλική προς το περιβάλλον και περιορίζεται από τις πρώτες ύλες. Τα τελευταία 30 χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι παραγωγής του κιτρικού οξέος με την χρήση της *Y.lipolytica* η οποία μπορεί να χρησιμοποιήσει διάφορα υποστρώματα: αιθανόλη, γλυκερόλη, γλυκόζη, φυτικά έλαια (Morgunov et al., 2013). Μειονέκτημα αποτελεί, ειδικότερα των άγριων τύπων των στελεχών της για την παραγωγή κιτρικού οξέος, η ταυτόχρονη έκκριση ισοκιτρικού οξέος το οποίο εμφανίζει ορισμένες διαφορές. Πολύ συχνά το ισοκιτρικό οξύ αναφέρεται ως ποσοστό του κιτρικού οξέος διότι δεν είναι εφικτός ο διαχωρισμός τους από την HPLC (Rywińska et al., 2011).

Πολυόλες

Οι πολυόλες είναι υδατάνθρακες των οποίων η καρβονυλομάδα έχει αναχθεί σε μια πρωτοταγή ή δευτεροταγή ομάδα υδροξυλίου. Ο σχηματισμός πολυολών αποτελεί μέρος των φυσιολογικών διεργασιών ανάπτυξης και βασίζεται στις ιδιότητες του στελέχους που έχει καλλιεργηθεί και στις συνθήκες που επικρατούν. Ζυμομύκητες οι οποίοι παράγουν κιτρικό οξύ, κάτω από ευνοϊκές συνθήκες και συγκεκριμένα σε pH 2.5 έως 3.5 μπορούν να παράγουν πολυόλες (Tomaszewska et al., 2014, Tzirita et al., 2019). Ωστόσο, αυτή η σχέση μπορεί να χαρακτηριστεί ως αντιστρόφως ανάλογη καθώς σε χαμηλές τιμές pH δεν ευνοείται η παραγωγή κιτρικού οξέος. Συνήθως, οι περισσότεροι ζυμομύκητες παράγουν ίχνη μιας ή και περισσότερες πολυόλες, ωστόσο έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερη παραγωγή από είδη τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ανεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων ή σακχάρων (Rywińska et al., 2011, Rywińska et al., 2015, Sarris et al., 2019). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την παραγωγή πολυολών παρουσιάζει η ζύμη *Y.lipolytica* καθώς μπορεί να αναπτυχθεί σε έντονα όξινο περιβάλλον (Tomaszewska et al., 2012). Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι στελέχη του ζυμομύκητα *Y.lipolytica* μπορούν να παράγουν ερυθριτόλη, μαννιτόλη και αραβιτόλη.

Ερυθριτόλη

Αποτελεί μια σακχαρική αλκοόλη με τέσσερα άτομα άνθρακα η οποία βρίσκεται ευρέως στη φύση, όπως σε διάφορα άγλη/φύκη, μανιτάρια, φρούτα αλλά και σε ζυμώμενα τρόφιμα. Πάνω από το 90% της απορροφώμενης ερυθριτόλης δεν μεταβολίζεται από τον ανθρώπινο οργανισμό με αποτέλεσμα να αποβάλλεται από το σώμα μέσω των φυσιολογικών μηχανισμών χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης στο αίμα. Επίσης, πρόκειται για μια ασφαλή ουσία, που μπορεί να καταναλώνεται σε καθημερινή βάση καθώς τοξικολογικές μελέτες και έρευνες δεν έχουν δείξει αρνητικά αποτελέσματα (Κουκουμάκη, 2020). Συμπερασματικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τρόφιμα τα οποία απευθύνονται σε άτομα που πάσχουν από διαβήτη και παχυσαρκία. Ακόμα, οι λειτουργικές και αισθητικές της ιδιότητες επιτρέπουν στη βιομηχανία να την χρησιμοποιήσει ως φυσικό γλυκαντικό, καθώς το επίπεδο γλυκύτητας της είναι 60-80% σε σχέση με τη σακχαρόζη. Λόγο της χαμηλής θερμιδικής της αξίας, στο γεγονός ότι η μεταβολή τα δεν προκαλεί υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα και της εύκολης διαλυτότητας συχνά χρησιμοποιείται ως συστατικό τροφίμων, υποκατάστατο ζάχαρης και ως μέσο για την παραγωγή φαρμακευτικών ουσιών. Συνήθως, παράγεται μικροβιολογικά με την χρήση ωσμώφιλων ζυμομυκήτων όπως *Pichia* sp., *Candida* sp., *Torula* sp, *Trichosporon* sp. ή μέσω ορισμένων γαλακτικών βακτηρίων κάτω από αναερόβιες συνθήκες (Tomaszewska et al., 2012, Rywińska et al., 2015, Dourou et al., 2016).

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Μαννιτόλη

Η μαννιτόλη είναι μια αλκοόλη 6 ατόμων άνθρακα η οποία επίσης εντοπίζεται ευρέως στη φύση. Έχει πολλές εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων, στην ιατρική και στην φαρμακευτική βιομηχανία. Βρίσκεται επίσης, σε διάφορα φυτά, άλγη, σε μικκύλια μυκήτων και αποτελεί ένα από τα κυριότερα δομικά στοιχεία των μανιταριών. Επί του παρόντος παράγεται βιομηχανικά μέσω της χημικής σύνθεσης κατά την οποία λαμβάνει χώρα υδρογόνωση της φρουκτόζης σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση (Κουκουμάκη, 2020). Ωστόσο η συγκεκριμένη διαδικασία δεν είναι αρκετά αποτελεσματική και απαιτεί υψηλή καθαρότητα των υποστρωμάτων οπότε η στρόφη στη μικροβιολογική παραγωγή μαννιτόλης θα αποτελεί καλή εναλλακτική (Tomaszewska et al., 2012, Rysińska et al., 2013, Dourou et al., 2016).

Αραβιτόλη

Αποτελεί επίσης, σακχαρική αλκοόλη που αποτελείται από 5 άτομα άνθρακα και είναι εναντιομερές της ξυλιτόλης. Εμφανίζουν μεγάλη διαλυτότητα στο νερό, ενώ η τελική τους μορφή μετά την διαδικασία καθαρισμού είναι κρυσταλλική. Ο καταβολισμός της αραβιτόλης από τον μικροοργανισμό *E.coli* περιλαμβάνει τον σχηματισμό της φωσφορικής αραβιτόλης, η οποία αποτελεί αντιβακτηριδιακό παράγοντα ιδιότητα η οποία καθιστά δυνατή τη χρήση της αραβιτόλης ως παράγοντα μείωσης της τερηδόνας. Μεταξύ άλλων, λόγω της χαμηλής θερμιδικής της αξίας δύναται να αντικαταστήσει την ξυλιτόλη ως φυσικό γλυκαντικό και ως υποκατάστατο σακχάρου για διαβητικούς ασθενείς. Είναι γνωστό πως η παραγωγή αραβιτόλης μπορεί να επιτευχθεί τόσο χημικά όσο και βιολογικά και παράγεται από ωσμώφιλους ζυμομύκητες κυρίως των ειδών *Candida*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* και *Saccharomycopsis* (Koganti et al., 2011, Tomaszewska et al., 2014, Rysińska et al., 2015).

Ενδοπολυσακχαρήτες

Οι βιοχημικές διεργασίες που οδηγούν σε παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών ή/και αποθήκευση λίπους εντάσσονται στην κατηγορία των ανταγωνιστικών διεργασιών και σχετίζονται με την κατανάλωση αζώτου στο μέσο. Το χαμηλό ποσοστό αζώτου οδηγεί στην μείωση της δράσης της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP), γεγονός που οδηγεί στην συσσώρευση κιτρικού οξέος στα μιτοχόνδρια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η NAD⁺ και η ισοκιτρική αφυδρογόνωση ενεργοποιούνται αλλοστερικά με την παρουσία AMP. Μετά την υπέρβαση της κρίσιμης τιμής συσσώρευσης, το κιτρικό οξύ εκκρίνεται στο κυτταρόπλασμα, όπου διασπάται σε ακετυλο- CoA και οξαλοξικό οξύ. Η αντίδραση αυτή, καταλύεται από το ένζυμο ATP κιτρική λυάση. Η συνεχής μείωση του AMP εμποδίζει τη δράση του παραπάνω ενζύμου με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δράση του ενζύμου 6- φωσφορο φρουκτοκινάση, που έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών (Tchakouteu et al., 2015).

Έκκριση πρωτεϊνών

Ο ζυμομύκητας, *Yarrowia lipolytica* αποτελεί μικροοργανισμό ο οποίος έχει την ικανότητα να εκκρίνει εξωκυτταρική πρωτεΐνη και αποτελεί ένα αποτελεσματικό- ασφαλές εργαλείο για αυτή τη διαδικασία καθώς έχει χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally recognized as safe). Τα στελέχη της ζύμης εκκρίνουν πρωτεάσες, λιπάσες, RNάσες και άλλα ένζυμα. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη εργαλείων γενετικής μηχανικής και τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί επιτυχείς εκφράσεις των ακόλουθων γονιδίων: τυροσινάση, ινβεργτάση, θερμοσταθερή εστεράση και υδροξείδιο εποξειδίου. Από τα παραπάνω ένζυμα, ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι λιπάσες, καθώς αποτελούν χρήσιμους βιοκαταλύτες σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς συμπεριλαμβανομένων των

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

πρόσθετων τροφίμων, ελαιοχημικών, υφασμάτων, απορρυπαντικών, βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών κ.α. Επίσης ερευνάται η χρήση τους ως πρόσθετες ύλες ζωοτροφών (Rywińska et al., 2013, Yan et al., 2018).

Ζύμες

Ζύμες (ζυμομύκητες ή μαγιά) είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί οι οποίοι ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων. Προέρχονται από πολυκύτταρους μικροοργανισμούς, κάτι που τους επιτρέπει σε ορισμένα είδη να σχηματίζουν νημάτια και ψευδο-υφές. Πρόκειται για αερόβιους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς όπου η ανάγκη τους σε οξυγόνο αλλάζει ανάλογα με το είδος τους. Σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποιο υποχρεωτικά αναερόβιο είδος ζυμομύκητα. Επιπρόσθετα, το μέγεθος των ζυμών ποικίλει (3-40nm) και εξαρτάται από το περιβάλλον και τις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται. Η φυλογενετική ποικιλότητα των ζυμών ταξινομείται σε 2 κατηγορίες: τους ασκομύκητες και τους βασιδιομύκητες (Kurtzman 1994). Ο τρόπος ανάπτυξης τους ποικίλει και εξαρτάται από τον τύπο και την συγκέντρωση των οργανικών υλών των οποίων του παρέχονται ως πηγή ενέργειας. Τα είδη και τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούν, έχουν διαπιστωθεί ότι εξαρτώνται από τις υφιστάμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (Kutty and Philip 2008). Τέλος, οι ζύμες βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας, όπως τα ποτά και τρόφιμα, βιομηχανικές διεργασίες, ζυμώσεις, αποδίδοντας προϊόντα υψηλής αξίας.

Μικροβιακή ανάπτυξη και θρέψη ζυμών

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των ζυμών είναι απαραίτητη και πρέπει να αποτελείται από:

- Νερό: Το νερό πρέπει να υπάρχει τουλάχιστον σε ποσοστό 30% του θρεπτικού μέσου.
- Πηγή άνθρακα C: Οι ζύμες προσλαμβάνουν άνθρακα, δηλαδή ενέργεια από χημικές ενώσεις (χημειότροφοι μικροοργανισμοί) και κυρίως σάκχαρα. Η γλυκόζη μεταβολίζεται από όλα τα είδη, ενώ αρκετές ζύμες προτιμούν την διάσπαση δισακχαριτών ως πηγή άνθρακα. Τέλος, το διοξείδιο του άνθρακα μπορεί να καλύψει το 5% των απαιτήσεων και χρησιμοποιείται για βιοσύνθεση δομικών στοιχείων όπως αμινοξέα, πουρίνες, πυριμιδίνες, λιπαρά οξέα. (Koukoymaki, 2020)
- Πηγή αζώτου N
- Πηγή O: Σε συνθήκες πλήρης απουσίας οξυγόνου οι ζύμες δεν αναπτύσσονται, καθώς αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αναπνοή και την σύνθεση στερολών/λιπαρών οξέων.
- Στοιχεία για την κυτταροπλασσία: Απαραίτητα είναι κυρίως, το θείο, φώσφορος και το μαγνήσιο. Τα ιόντα υδρογόνου έχουν ιδιαίτερη σημασία για την ανάπτυξη των ζυμών γιατί ρυθμίζουν το ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο pH. Οι τιμές ανάπτυξης των ζυμών είναι 4.0-6.0.
- Βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, αυξητικοί παράγοντες

Ο κύκλος ανάπτυξης των ζυμών αποτελείται από:

1. Λανθάνουσα φάση. Πραγματοποιείται η προσαρμογή των κυττάρων στις νέες συνθήκες χωρίς να παρατηρείται αύξηση πληθυσμού.
2. Φάση επιτάχυνσης. Έναρξη πολλαπλασιασμού των κυττάρων.
3. Εκθετική φάση. Σε αυτήν την φάση, τα κύτταρα αναπτύσσονται με γοργό ρυθμό. Η καμπύλη ανάπτυξης παρουσιάζει απότομη αύξηση.
4. Φάση επιβράδυνσης. Η ταχύτητα ανάπτυξης των κυττάρων μειώνεται.

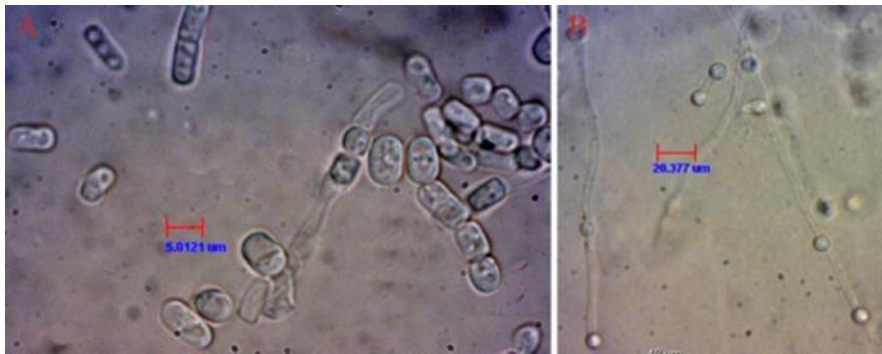
«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

5. Στατική φάση. Ο πληθυσμός των κυττάρων είναι μεταβολικά ενεργός, ωστόσο δεν παρατηρείται κυτταρική αύξηση. Η καμπύλη ανάπτυξης σε αυτό το στάδιο είναι οριζόντια.
6. Φάση θανάτου. Σε αυτό το στάδιο, τα κύτταρα λύνονται, και απελευθερώνονται ενδοκυττάρια συστατικά. Η μείωση των κυττάρων μεταφράζεται σε κάθοδο της καμπύλης αναφοράς.

Μορφολογία μικροοργανισμού και μεταβολικά μονοπάτια- *Trichosporon coremiforme* EXF8679

Γενικά

Το γένος *Trichosporon* είναι γένος αναμορφικών μυκήτων τη οικογένειας *Trichosporonaceae* και αποτελούν ζυμομύκητες χωρίς γνωστά τηλεόμορφα- σεξουαλικά αναπαραγωγικούς οδούς. Τα περισσότερα στελέχη παρατηρούνται συνήθως στο έδαφος, αλλά αρκετά είδη εμφανίζονται στην φυσική μικροχλωρίδα του δέρματος των ανθρώπων και ζώων. Η ανάπτυξη τους στα μαλλιά (ιδιαίτερα σε συνθήκες υψηλής υγρασίας) μπορεί να οδηγήσει σε μια δυσάρεστη αλλά όχι σοβαρή κατάσταση γνωστή ως *White Piedra* (Gueho, 1992) αλλά και σοβαρές ευκαιριακές λοιμώξεις (τριχοσπορίωση) σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα.



Εικόνα 7: Μορφολογία *Trichosporon coremiforme*

Ταξινόμηση

Το γένος περιεγράφηκε πρώτη φορά από τον Γερμανό δερματολόγο Gustav Behrend το 1890, από ζυμομύκητες που είχαν απομονωθεί από τρίχες ενός μουστακιού, όπου προκαλούσαν την πάθηση *White Piedra*. Ο Behrend ονόμασε το νέο του είδος *Trichosporon onoides*, ωστόσο, οι Friedrich Küchenmeister/Rabenhorst είχαν περιγράψει παλαιότερα ένα είδος το 1867 από τις τρίχες μιας περούκας όπου είχαν θεωρήσει ότι ο οργανισμός ήταν άγη και τον τοποθέτησαν στο γένος *Pleurococcus* ως *Pleurococcus beigelii*. Ο Γάλλος μυκητολόγος Vuillemin αργότερα συνειδητοποίησε ότι ήταν ζυμομύκητας και τη μετέφερε στο γένος *Trichosporon*, συνδέοντας την με την παλαιότερη ονομασία του *Trichosporon onoides*. Αρχικά το γένος *trichosporon* εκτιμιότανε ότι αριθμεί πάνω από 100 επιπλέον είδη ζυμομυκήτων αλλά με την ανάληψη της αλληλουχίας DNA έγινε σαφές ότι πολλά από τα είδη ανήκαν σε άλλα γένη. Με βάση την κλαδιστική ανάλυση των αλληλουχιών DNA, 12 είδη είναι πλέον αποδεκτά στο γένος αυτό. Αποτέλεσμα της αλληλουχία του DNA έδειξε επίσης ότι η πάθηση *White Piedra* μπορεί να προκληθεί από περισσότερα από ένα είδη *Trichosporon*. (Genus Record Details-*Trichosporon*, 2010)

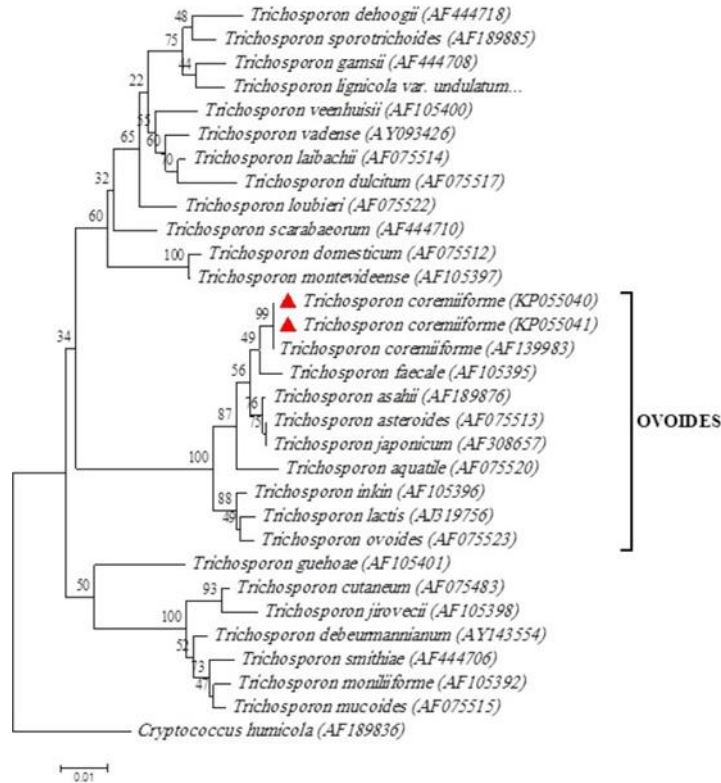
Βιότοπος

Τα είδη του *Trichosporon* και τα σχετικά γένη είναι ευρέως διαδεδομένα και έχουν απομονωθεί από ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων τριχών, του εδάφους, των λαχανικών, του τυριού, των σκαραβαίων, περιττώματα παπαγάλου (*T. coremiforme*) και σε θαλασσινό νερό.

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Μορφολογία

Τα είδη *Trichosporon* διακρίνονται μικροσκοπικά έχοντας κύτταρα ζυμομύκητα που βλασταίνουν για να παράγουν υαλικές υφές που αποσαθρώνονται στα διαφράγματα (αποτελούνται από μαλακούς, ωχρούς όζους που περιέχουν κύτταρα ζύμης και σχηματίζονται στις τρίχες του τριχωτού της κεφαλής και του σώματος), με τα διαμερίσματα των υφών να λειτουργούν ως αρθροκονίδια- ασεξουαλικοί πολλαπλασιαστές. Ωστόσο, οι τελεόμορφες σεξουαλικές καταστάσεις δεν είναι γνωστές.



Εικόνα 8: Ανάλυση του γένους *Trichosporon*.

Κατανάλωση σακχάρων

Ο καταβολισμός των λιπιδίων πραγματοποιείται με τον βιολογικό μηχανισμό της γλυκόλυσης. Ως γλυκόλυση, χαρακτηρίζεται η βιοχημική διεργασία της διάσπασης σακχάρων (ιδιαίτερα της γλυκόζης). Η γλυκόλυση αποτελεί το πρώτο στάδιο της κυτταρικής αναπνοής των κυττάρων και πραγματοποιείται τόσο αερόβια όσο και αναερόβια. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η γλυκόλυση λαμβάνει χώρα στο κυτοσόλιο. Κατά το στάδιο της γλυκόλυσης, η γλυκόζη μετατρέπεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος.

Τα στάδια της γλυκόλυσης είναι τρία:

Στάδιο 1

α) Η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται από το ATP και να σχηματίσει την 6-φωσφορική γλυκόζη. Η διεργασία καταλύεται από το ένζυμο της εξοκινάση.

β) Η 6-φωσφορική γλυκόζη ισομεριώνεται προς 6-φωσφορική φρουκτόζη και καταλύεται από την ισομεράση της φωσφογλυκόζης.

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

γ) Η 6-φωσφορική φρουκτόζη φωσφορυλιώνεται από το ATP για να σχηματίσει την 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, η οποία διασπάται σε φωσφορική διυδροξυακετόνη και σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη. Η διεργασία καταλύεται από το ένζυμο της αλδολάσης.

Στάδιο 2

α) Η φωσφορική διυδροξυακετόνη συνεχίζει την πορεία μόνο αν μετατραπεί σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη. Η αντίδραση καταλύεται από την ισομεράση των φωσφορικών τριοζών.

β) Δύο μόρια της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, μετατρέπονται σε 1,3-διφωσφογλυκερικό και καταλύεται από την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης.

Στάδιο 3

α) Το 1,3-διφωσφογλυκερικό μετασχηματίζεται σε 3-φωσφογλυκερικό και καταλύεται από την κινάση του φωσφογλυκερικού.

β) Το 3-φωσφογλυκερικό αναδιατάσσεται σε 2-φωσφογλυκερικό με τη βοήθεια της μούτάσης του φωσφογλυκερικού.

γ) Το 2-φωσφογλυκερικό αφυδατώνεται σε φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό το οποίο καταλύεται από το ένζυμο της ενολάσης.

δ) Τέλος, το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό, μετατρέπεται σε μια σταθερή κετόνη, το πυροσταφυλικό. Και καταλύεται από την κινάση του πυροσταφυλικού.

Στη συνέχεια από το πυροσταφυλικό μπορεί να σχηματιστεί: Γαλακτικό οξύ, Ακετυλο-Συνένζυμο Α ή Ακεταλδεϋδη.

Αναβολισμός λιπιδίων

Αναβολισμός λιπιδίων: Η παραγωγή λιπιδίων διακρίνεται σε de novo και ex novo βιοσύνθεση (Papanikolaou & Aggelis, 2011). De novo συσσώρευση λιπιδίων είναι μια αναβολική βιοχημική διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα μετά την εξάντληση του αζώτου του υποστρώματος. Έπειτα ο μικροοργανισμός τρέφεται από την πηγή άνθρακα που έχει απομείνει στο υπόστρωμα, η οποία μετατρέπεται σε τριγλυκερίδια (Papanikolaou, 2011). Οι συνθήκες περίσσειας άνθρακα- εξάντληση αζώτου οδηγούν σε υψηλή παραγωγή κιτρικού οξέος και κατ' επέκταση ακετυλο-συνενζύμου Α και οξαλοξικού οξέος. Μετά την αποσύνθεση του κιτρικού οξέος το ακετυλο- coA οδηγείται προς τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και κυρίως τριακυλογλυκερολών. Έπειτα τα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται με λιπίδια που παράγουν γλυκερόλη (φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια) και TAGs. Κατά την ex novo βιοσύνθεση λιπιδίων τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (που υπάρχουν ως αρχικό υπόστρωμα ή προκύπτουν μετά από υδρόλυση των τριγλυκεριδίων) ενσωματώνονται στο μικροβιακό κύτταρο με ενεργό μεταφορά. Έπειτα είτε διασπώνται με σκοπό την κατανάλωση τους είτε γίνονται υπόστρωμα για ενδοκυτταρικούς βιοσχηματισμούς, οι οποίοι αφορούν τη σύνθεση «νέων» προφίλ λιπαρών οξέων που δεν υπήρχαν πριν στο υπόστρωμα. Τα εναπομείναντα λιπαρά οξέα αποικοδομούνται μέσω της βοξειδωσης δίνοντας ως προϊόν ακετυλο- coA το οποίο είναι απαραίτητο για την συντήρηση και ανάπτυξη των κυττάρων. Επίσης παράγονται διάφορες ενδιάμεσοι μεταβολίτες που αποτελούν πρόδρομες ουσίες για διάφορες κυτταρικές αντιδράσεις.

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Glucose	+	N-Acetyl-D-glucosamine	+
Galactose	+	Methanol	-
L-Sorbose	+	Ethanol	+
Sucrose	+	Glycerol	+
Maltose	+	Erythritol	+
Cellobiose	+	Ribitol	-
Trehalose	+	Galactitol	v
Lactose	+	D-Mannitol	+
Melibiose	-	D-Glucitol	+
Raffinose	-	α-Methyl-D-glucoside	+
Melezitose	+	Salicin	+
Inulin	-	D-Gluconate	+
Soluble starch	+	DL-Lactate	+
D-Xylose	+	Succinate	+
L-Arabinose	+	Citrate	v
D-Arabinose	+	Inositol	+
D-Ribose	+	Hexadecane	n
L-Rhamnose	+	Nitrate	-
D-Glucosamine	-	Vitamin-free	-

Εικόνα 8: Κατανάλωση σακχάρων από το γένος *Trichosporon*.

Παραγόμενα προϊόντα

Το γένος *Trichosporon* έχει συνδεθεί με την παραγωγή βιοφύλμ, ενζύμων, πηγή ενώσεων της κυτταρικής μεμβράνης, και ως πηγή αντιμικροβιακών μεμβρανών. Η ικανότητα προσκόλλησης και σχηματισμού βιοφίλμ και πραγματοποιείται με τον μηχανισμό της τριχοσπορίωσης. Η ικανότητα για παραγωγή βιοφίλμ μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την φαρμακευτική βιομηχανία για την παραγωγή αντιμυκητιακών και ανοσοαποκριτικών φαρμάκων. Η παραγωγή πρωτεασών και φωσφολιπασών (ενζύμων) από τους μικροοργανισμούς του γένους *Trichosporon* πραγματοποιείται για την σάρωση θρεπτικών ουσιών από το περιβάλλον (διάσπαση πρωτεϊνών). Τέλος, στελέχη του γένους *Trichosporon* παράγουν γλυκουρονοξυλομαννάνη (GXM) στα κυτταρικά τους τοιχώματα ο οποίος αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη που μπορεί να εξασθενίσει τη φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων *in vivo*. Βασιζόμενοι σε αυτήν την ιδιότητα, πολλοί ερευνητές έχουν αναπτύξει διάφορες εργαστηριακές έρευνες (όπως ο Karashima και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι τα προϊόντα απομόνωσης *T. asahii* θα μπορούσαν να αλλάξουν τον φαινότυπο και να αυξήσουν την ποσότητα του εκκρινόμενου GXM μετά τη διέλευση σε ένα μοντέλο ποντικού).

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματική διάταξη και διαδικασία

Βιολογικό υλικό-Ανανέωση στελέχους

Στην παρούσα διπλωματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Trichosporon coremiforme* EXF-8679 που προμηθευτήκαμε από την συλλογή του εργαστηρίου MyCosmo, Ljubliana, Slovenia και η πηγή του μικροοργανισμού είναι ένα πηγάδι. Η ανάπτυξη του ζυμομύκητα έγινε σε στερεό θρεπτικό μέσο το οποίο αποτελούνταν από 10g/L γλυκόζη, 10g/L yeast extract, 10g/ πεπτόνη και 20g/L agar. Πριν από την κάθε ζύμωση πραγματοποιούνταν ανανέωση του στελέχους για 24-48h στους 30°C σε επωαστικό κλίβανο.

Υπόστρωμα προκαλλιέργειας

Η χρήση προκαλλιέργειας πραγματοποιείται για την δημιουργία ευνοϊκών συνθηκών ανάπτυξης για τον μικροοργανισμό και αποτελείται από 10g/L γλυκόζη, 10g/L yeast extract και 10g/L πεπτόνη. Χρησιμοποιήθηκαν 2 κωνικές φιάλες ISOLAB 250ml, οι οποίες είχαν 50ml προκαλλιέργεια. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στους 121°C για 40min και μετά πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του στελέχους υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο LABWIT-ZWY-211C σε ανάδευση 200rpm στους 30°C και μετά από 24 ώρες, ελέγχεται με την χρήση μικροσκοπίου OLYMPUS η καθαρότητα της προκαλλιέργειας για να γίνει ο εμβολιασμός.

Θρεπτικό υπόστρωμα κυρίως καλλιέργειας

Ως θρεπτικό υπόστρωμα κυρίως καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν ΥΑΕ (κατσίγαρος) που παραλήφθηκαν από το ελαιοτριβείο «Ηφαιστος» στην Λήμνο. Το pH παρέμεινε ρυθμιζόμενο στην τιμή 7 με NaOH 5 M ενώ πραγματοποιήθηκε προσθήκη μεταλλικών αλάτων στις κυρίως καλλιέργειες (οι οποίες ήταν σταθερές για όλες τις σειρές πειραμάτων):

- KH_2PO_4 (7,00 g/L)
- $\text{NaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (2,50 g/L)
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (1,50 g/L)
- $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,06 g/L)
- $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,02 g/L)
- $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (0,15 g/L)
- $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,15 g/L)

Πειραματικός σχεδιασμός

1^ο στάδιο: Σχεδιασμός screening σε πρότυπα σάκχαρα

Υπόστρωμα	Συγκέντρωση	pH	C/N	T/rpm
Γλυκόζη	30g/L, 1g/L Y.E., 1g/L pep.		60	
Φρουκτόζη				
Γλυκόζη	30g/L, 0,5g/L Y.E., 0,5g/L pep.	7± 0,3	120	30 oC, 180rpm
Φρουκτόζη				
Λακτόζη				
Γλυκερόλη	30g/L, 1g/L Y.E., 1g/L pep.		60	

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

2° στάδιο: Σχεδιασμός screening σε κασίγαρο

Υπόστρωμα	Phenolic content g/L	Σάκχαρα g/L	pH	C/N	T/rpm	Ποιότητα σακχάρων
Κασίγαρος	2,36	30g/L, 0,5g/L Y.E., 0,5g/L pep.	7± 0,3	120	30 oC, 180rpm	80% γλυκόζη-20% φρουκτόζη
		60g/L, 2g/L Y.E., 1g/L pep.		120		100% φρουκτόζη
		55g/L, 0,5g/L Y.E., 0,5g/L pep.		200		
		55g/L, 0,5g/L Y.E., 0,5g/L pep.		300		
		55g/L, 0,5g/L Y.E., 0,5g/L pep.		400		
3	60g/L, 2g/L Y.E., 1g/L pep.		200			

Αναλυτικοί μέθοδοι

Προσδιορισμός και διόρθωση pH

Η μέτρηση του pH έγινε με εμφύσηση ηλεκτρονικού, φορητού, βαθμονομημένου pH-μέτρου μέσα σε δείγμα όγκου 10-15 mL. Σε όλες τις σειρές και κατά την διάρκεια των πειραμάτων το pH παρέμεινε στην τιμή 7 με την χρήση NaOH 5M ή HCl 5M υπό ασηπτικές συνθήκες.

Προσδιορισμός βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας πραγματοποιείται με μέτρηση ξηρού βάρους. Μετά την παραλαβή της κωνικής φιάλης από το κάθε σημείο, το υγρό της κωνικής μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι τα 50ml. Έπειτα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο HITTICH UNIVERSAL 320R στις 9000rpm, 10min, 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο υγρό καταψύχεται σε Falcon tubes 15ml για περαιτέρω αναλύσεις. Ακολουθεί έκπλυση με απιονισμένο νερό και δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες με σκοπό τον καθαρισμό των κυττάρων της βιομάζας. Τέλος, η καθαρή πλέον βιομάζα συλλέγεται σε προ ζυγισμένο φιαλίδιο McCartney το οποίο μεταφέρεται σε φούρνο όπου πραγματοποιείται ξήρανση στους 80°C για 72h. Μετά την ξήρανση η διαφορά του βάρους μετά-πριν την προσθήκη/εξάτμιση του νερού στο φιαλίδιο είναι η ποσότητα της βιομάζας και εκφράζεται σε g/L.

Προσδιορισμός του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του λίπους χρησιμοποιείται ο οργανικός διαλύτης FOLCH (Χλωροφόρμιο CHCl₃- μεθανόλη CH₃OH 2:1). Το διάλυμα FOLCH, προστίθεται στα φιαλίδια McCartney τα οποία περιέχουν την ξηραμένη βιομάζα και διατηρούνται κλειστά αεροστεγώς σε απουσία φωτός για 72ώρες. Μετά τις 72 ώρες πραγματοποιείται διήθηση του μίγματος σε προ ζυγισμένες σφαιρικές φιάλες εξάτμισης. Έπειτα, πραγματοποιείται εξάτμιση του διηθήματος σε περιστροφικό εξάτμιστήρα LABOPORT N820 FT.18 σε θερμοκρασία 50-55°C, μέχρι την ολική εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Τέλος, οι φιάλες ζυγίζονται και το ενδοκυτταρικό λίπος υπολογίζεται από την διαφορά του βάρους της φιάλης με-χωρίς τον διαλύτη και εκφράζεται σε g/L.

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Αποφαινελοποίηση

Μετά από κατάλληλες αραιώσεις παραλήφθηκε δείγμα 0,2 mL και έγινε προσθήκη 10,8 mL απιονισμένου νερού, 8 mL διαλύματος Na_2CO_3 και 1 mL αντιδραστηρίου Folin- Ciocalteu. Στο τυφλό δείγμα ακολουθείται η ίδια διαδικασία με προσθήκη 0,2 mL απιονισμένου νερού αντί δείγματος. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες σκότους για τουλάχιστον 2 ώρες και έπειτα έγινε μέτρηση τους σε απορρόφηση 750nm σε φωτόμετρο τύπου Shimadzu uv 1900i. Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (g/L).

Αποχρωματισμός

Για να προσδιοριστεί η ικανότητα αποχρωματισμού του ζυμομύκητα γίνεται αραιώση 1 προς 30 σε όλα τα σημεία της ζύμωσης. Κάθε δείγμα ρυθμίζεται σε pH 6 με 6,3 και πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 395nm. Το τυφλό δείγμα αποτελείται από απιονισμένο νερό. Το ποσοστό αποχρωματισμού υπολογίζεται από τον τύπο $\%A = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$, όπου η τιμή A_0 αντιστοιχεί στην απορρόφηση του μηδενικού σημείου της ζύμωσης και η τιμή A_1 αντιστοιχεί στα αντίστοιχα σημεία της ζύμωσης.

Προσδιορισμός ελεύθερων σακχάρων (ενδοπολυσακχαρίτες)

Ο προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών επιτυγχάνεται με την φασματοφωτομετρική μέθοδο ανάλυσης αναγόντων σακχάρων (DNS) (Miller, 1953). 0,5 mL από το κάθε δείγμα για έλεγχο λαμβάνεται και 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS και μεταφέρονται σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα (αυτό το στάδιο γίνεται εις διπλούν με σκοπό την επαναληψιμότητα των μετρήσεων). Για το τυφλό δείγμα, λαμβάνονται 0,5 mL απιονισμένου νερού και 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες βράζουν για 5 λεπτά στους 100o C και αφού κρυσώσουν προστίθενται 5 mL απιονισμένου νερού στον καθένα. Τέλος, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 540nm και τα σάκχαρα εκφράζονται σε ισοδύναμα γλυκόζης (g/L).

Προσδιορισμός ελεύθερων αμινοομάδων (FAN)

Η μέθοδος αποτελεί ποσοτικό προσδιορισμό ελεύθερων ομάδων αμινοαζώτου και βασίζεται στον χρωματισμό της νινυδρίνης. Μετά από κατάλληλες αραιώσεις η φωτομέτρηση πραγματοποιείται στα 540 nm και οι ελεύθερες ομάδες αμινοαζώτου εκφράζονται σε ισοδύναμα νινυδρίνης.

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας αναγράφονται όπως παρακάτω:

1^ο στάδιο: Καλλιέργεια σε πρότυπα σάκχαρα

Table C/N=60 glucose equivalents									
Hours	Biomass g/l	Sugars g/l	Sugars consumed %	Oils g/l	FAN mg/l	FAN consumed %	oil free biomass	yield (g/g)	% oil content
0	0,0	34,2		0,0	67,6		0,0		
24	3,1	18,1	47,0	0,2	16,4	75,8	2,8	0,01	7,4
48	5,9	10,8	68,4	0,7	9,0	86,6	5,2	0,03	11,6
72	8,3	10,9	68,1	1,0	8,3	87,7	7,3	0,04	12,2
96	8,8	10,9	68,2	0,9	6,4	90,5	7,9	0,04	10,6
120	8,5	9,8	71,4	0,9	6,3	90,7	7,5	0,04	10,9
144	8,2	7,3	78,5	0,9	4,9	92,8	7,3	0,03	10,5
168	8,0	7,9	76,8	0,8	4,6	93,2	7,2	0,03	10,1

Table 3: C/N=60 fructose equivalents									
Hours	Biomass g/l	Sugars g/l	Sugars consumed %	Oils g/l	FAN mg/l	FAN consumed %	oil free biomass	yield (g/g)	% oil content
0	0,0	32,2		0,0	67,7		0,0		
24	2,2	17,5	45,6	0,3	11,1	83,6	1,9	0,01	12,3
48	5,1	11,3	65,0	0,6	10,3	84,8	4,5	0,03	11,1
72	7,0	10,9	66,2	0,7	6,6	90,3	6,3	0,07	10,5
96	7,6	10,4	67,6	1,3	4,5	93,4	6,4	0,12	16,6
120	7,8	10,4	67,8	0,9	4,2	93,9	6,9	0,09	11,5
144	9,7	10,2	68,5	0,8	4,1	94,0	8,9	0,08	8,5
168	8,0	8,7	73,0	0,8	3,4	95,0	7,2	0,08	10,0

Table 2: C/N=120 glucose equivalents									
Hours	Biomass g/l	Sugars g/l	Sugars consumed %	Oils g/l	FAN mg/l	FAN consumed %	oil free biomass	yield (g/g)	% oil content
0	0,0	32,5		0,0	32,6		0,0		
24	3,5	18,2	43,9	0,4	9,0	72,5	3,1	0,02	0,2
48	6,8	10,2	68,5	0,7	5,2	83,9	6,1	0,03	10,7
72	7,7	10,0	69,3	1,2	4,3	86,7	6,5	0,05	16,0
96	13,0	9,2	71,6	1,1	3,1	90,4	12,0	0,05	8,2
120	10,9	8,6	73,6	1,02	3,0	90,8	9,9	0,04	9,4
144	10,2	7,7	76,4	1,0	2,9	91,3	9,3	0,04	9,3
168	9,9	6,3	80,5	0,9	2,7	91,8	9,0	0,03	9,1

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Table 4 C/N= 120 fructose equivalents									
Hours	Biomass g/l	Sugars g/l	Sugars consumed %	Oils g/l	FAN mg/l	FAN consumed %	oil free biomass	yield (g/g)	% oil content
0	0,0	33,7		0,0	30,2		0,0		
24	2,2	16,7	50,5	0,6	8,7	71,3	1,7	0,01	21,2
48	5,1	10,3	69,5	1,3	5,0	83,5	3,8	0,08	26,2
72	7,0	10,0	70,2	2,5	4,4	85,6	4,5	0,24	35,3
96	7,7	9,0	73,2	1,7	4,1	86,3	6,0	0,17	21,6
120	8,5	8,9	73,7	1,3	4,0	86,8	7,3	0,14	14,7
144	8,1	8,3	75,3	0,9	3,7	87,9	7,1	0,10	11,5
168	7,2	8,0	76,2	0,9	3,5	88,3	6,3	0,11	12,3

Table 5: Glycerol and Lactose results	
C/N=60 glycerol	C/N=60 Lactose
No microbial oil production	No microbial oil production

2^ο στάδιο: Καλλιέργεια σε υπόστρωμα κασίγαρου

Table 6: C/N=120 80% glucose & 20% fructose									
Hours	Biomass g/l	Sugars g/l	Sugars consumed %	Oils g/l	FAN mg/l	FAN consumed %	oil free biomass	yield (g/g)	% oil content
0	0,0	27,9		0,0	34,3		0,0		0,0
24	2,4	14,0	50,0	0,3	11,7	68,9	2,1	0,02	11,1
48	3,5	4,2	85,0	0,6	4,3	87,4	2,9	0,03	17,6
72	3,9	4,2	85,0	0,7	4,2	87,7	3,2	0,03	18,5
96	4,7	4,2	85,0	1,2	3,5	89,9	3,5	0,05	26,0
120	6,5	4,2	85,0	1,1	3,2	90,6	5,4	0,05	17,2
144	5,1	3,4	87,9	0,9	3,2	90,7	4,2	0,04	17,5
168	4,6	3,5	87,5	0,9	3,1	90,9	3,8	0,04	18,7

Table 7: C/N=120 fructose									
Hours	Biomass g/l	Sugars g/l	Sugars consumed %	Oils g/l	FAN mg/l	FAN consumed %	oil free biomass	yield (g/g)	% oil content
0	0,0	27,8		0,0	33,8		0,0		0,0
24	2,9	9,1	67,4	0,3	6,2	81,7	2,6	0,01	9,8
48	3,6	4,1	85,2	0,7	5,5	83,6	2,8	0,03	20,6
72	4,8	4,2	85,1	1,4	4,3	87,4	3,4	0,06	29,3
96	5,9	4,2	85,0	0,9	3,3	90,2	5,0	0,04	15,2
120	4,7	4,0	85,6	0,8	3,0	91,0	3,9	0,03	16,8

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

144	3,0	4,2	85,1	0,7	2,7	92,0	2,4	0,03	21,6
168	2,3	2,6	90,5	0,3	2,6	92,2	2,0	0,01	13,1

Table 8: C/N= 200 fructose

Hours	Biomass g/l	Sugars g/l	Sugars consumed %	Oils g/l	FAN mg/l	FAN consumed %	oil free biomass	yield (g/g)	% oil content
0	0,0	55,8		0,0	86,1		0,0		0,0
24	2,3	27,9	50,0	0,5	22,6	73,8	1,7	0,0	23,8
48	4,0	15,7	72,0	1,2	12,2	85,9	2,7	0,0	31,0
72	5,2	8,4	85,0	2,2	6,6	92,4	2,9	0,1	43,2
96	5,9	8,4	85,0	1,5	4,5	94,8	4,4	0,0	25,9
120	6,0	6,8	87,9	0,8	4,2	95,2	5,2	0,0	13,8
144	5,6	4,7	91,7	0,4	4,1	95,3	5,2	0,0	6,5
168	4,1	4,0	92,8	0,3	3,4	96,1	3,8	0,0	6,0

Table 9: C/N=300 fructose

Hours	Biomass g/l	Sugars g/l	Sugars consumed %	Oils g/l	FAN mg/l	FAN consumed %	oil free biomass	yield (g/g)	% oil content
0	0,0	52,3		0,0	11,4		0,0		0,0
24	2,3	21,5	34,5	0,8	3,0	73,8	1,5	0,0	34,3
48	2,7	11,2	57,0	1,2	1,9	83,3	1,5	0,0	44,9
72	3,2	8,7	68,1	1,1	1,1	90,1	2,1	0,0	34,8
96	4,2	7,5	75,5	1,0	1,0	91,3	3,3	0,0	22,6
120	3,7	5,2	81,1	0,8	0,8	93,1	3,0	0,0	21,1
144	2,4	4,2	87,2	0,7	0,5	95,3	1,7	0,0	28,6
168	2,3	4,1	87,6	0,5	0,4	96,5	1,8	0,0	22,5

Table 10: C/N=400 fructose equivalents

Hours	Biomass g/l	Sugars g/l	Sugars consumed %	Oils g/l	FAN mg/l	FAN consumed g/L	oil free biomass	yield (g/g)	% oil content
0	0,0	73,6		0,0	11,2		0,0		0,0
24	2,8	35,7	50,3	1,4	2,2	80,4	1,4	0,0	49,5
48	2,9	17,5	68,6	1,1	1,3	88,0	1,7	0,0	39,2
72	3,2	12,7	77,2	1,0	1,1	89,9	2,2	0,0	30,7
96	4,4	8,5	84,8	1,0	1,0	91,4	3,4	0,0	22,6
120	3,2	6,6	88,2	1,1	0,8	93,3	2,1	0,0	33,2
144	2,5	4,9	91,2	1,0	0,5	95,1	1,5	0,0	39,0
168	1,8	4,3	92,2	0,7	0,5	95,8	1,2	0,0	36,0

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Hours	Biomass g/l	Sugars g/l	Sugars consumed %	Oils g/l	FAN mg/l	FAN consumed g/L	oil free biomass	yield (g/g)	% oil content
0	0,0	56,2		0,0	11,2		0,0		0,0
24	2,3	22,7	60,3	0,9	2,2	80,4	1,3	0,0	40,7
48	2,8	13,4	68,6	1,3	1,3	88,0	1,5	0,0	45,2
72	3,4	9,7	77,2	1,2	1,1	89,9	2,2	0,0	35,4
96	4,4	8,6	84,8	1,0	1,0	91,4	3,5	0,0	21,6
120	3,8	6,6	88,2	0,8	0,8	93,3	3,1	0,0	20,5
144	2,6	4,9	91,2	0,7	0,5	95,1	1,9	0,0	26,5
168	2,6	4,3	92,2	0,5	0,5	95,8	2,1	0,0	19,9

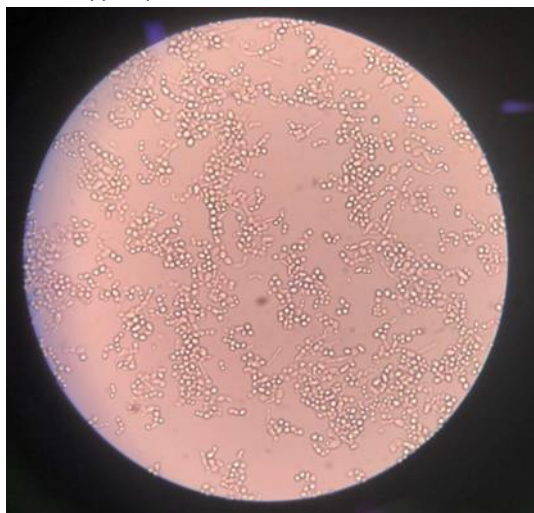
Αποχρωματισμός- Αποφαινελοποίηση

Μετά από 168 ημέρες μικροβιακής ζύμωσης η μέγιστη μείωση φαινολικού φορτίου/ αποχρωματισμού στα δείγματα αναγράφονται στον πίνακα:

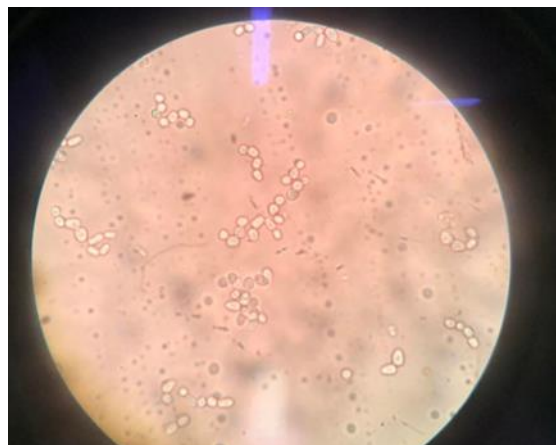
C/N	Po (g/L)	Sugars	Decolorization (%)	Phenol reduction (%)
120	2.4	80% glycose-20% fructose	39,2	34,9
120			42,6	40,4
200		100% fructose	44,3	45,0
300			37,1	35,7
400			34,6	32,6
200	3.0		35,7	34,5

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

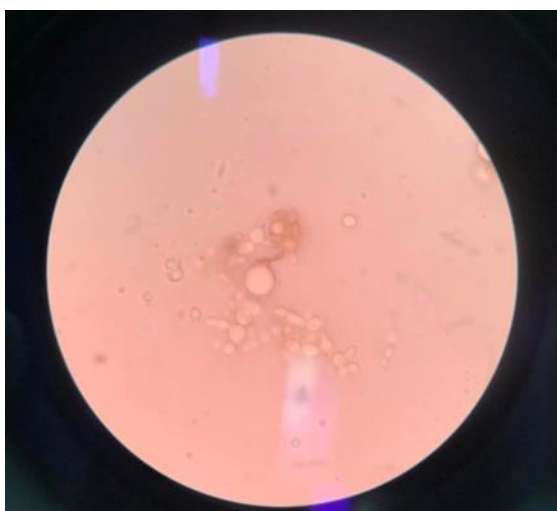
Φωτογραφικό υλικό



T.C. σε υπόστρωμα γλυκόζη (C/N=120)



T.C.σε κασίγαρο C/N=120 F



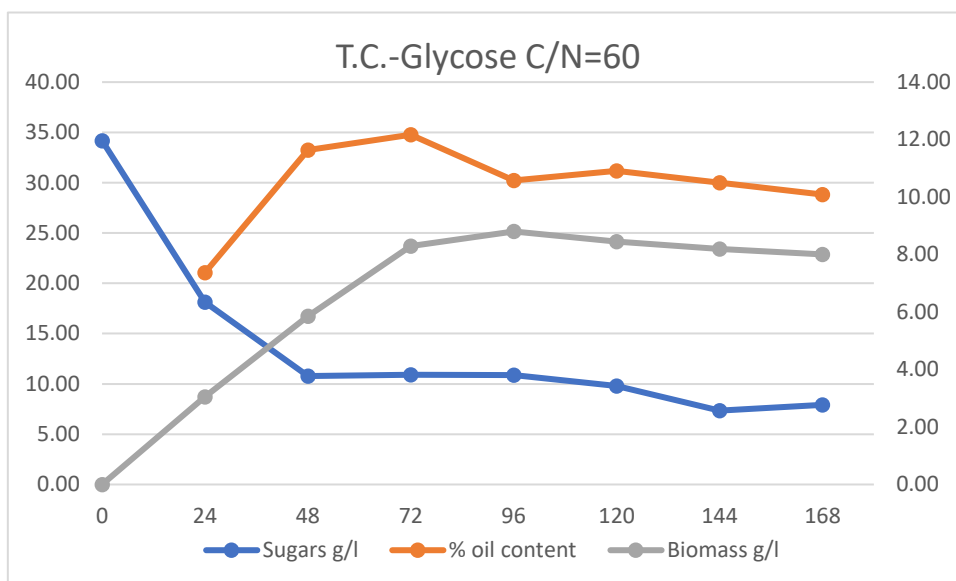
T.C. σε κασίγαρο C/N=300F



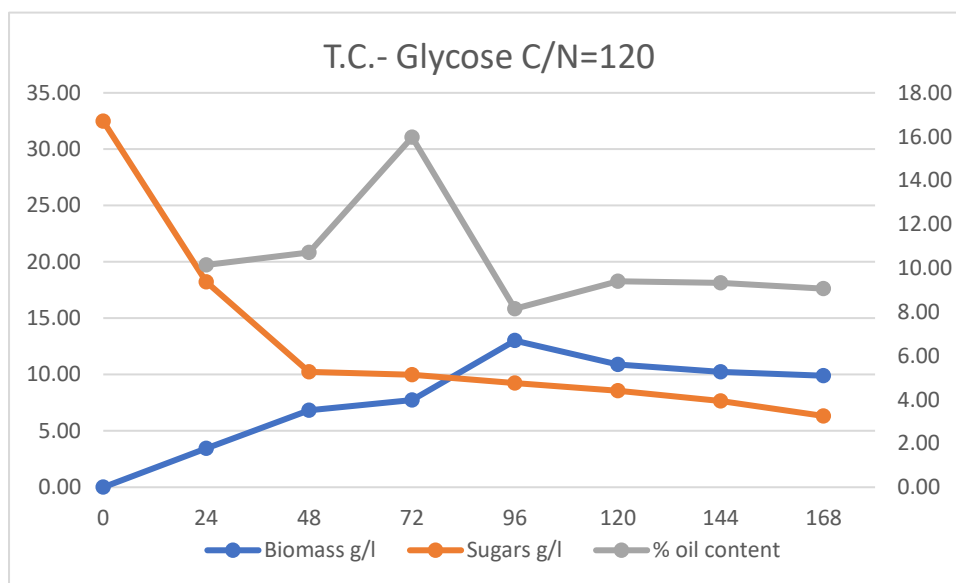
T.C. σε κασίγαρο C/N=200 (50% conc.)

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Διαγράμματα

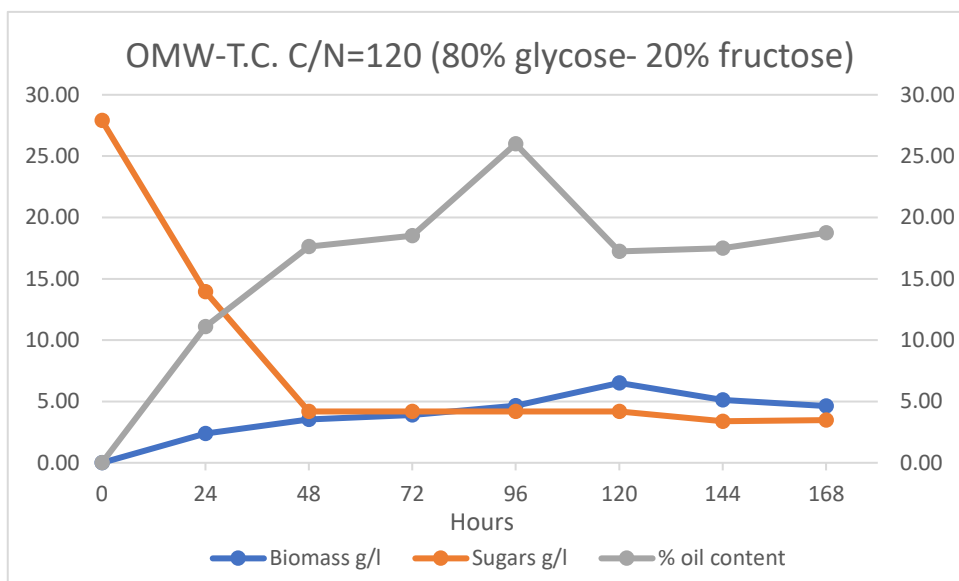


Γράφημα 1: Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε γλυκόζη C/N=60

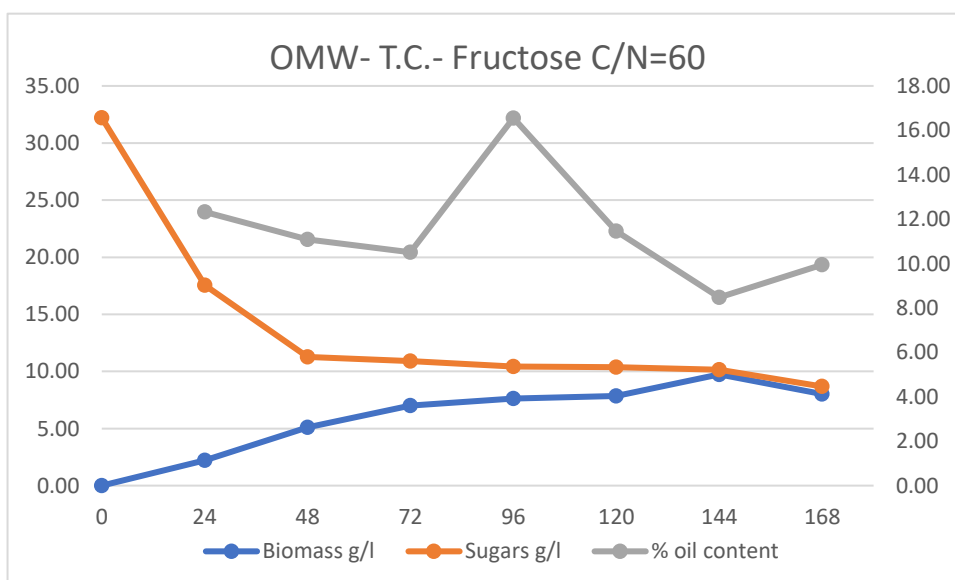


Γράφημα 2: Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε γλυκόζη C/N=120

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

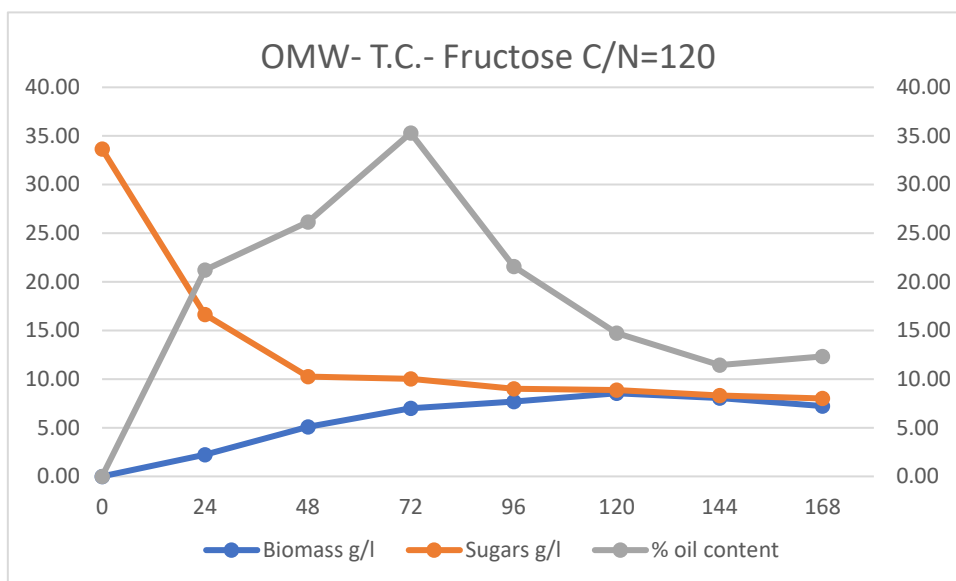


Γράφημα 3: Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασιίγαρου με την προσθήκη σακχάρων προσομοίωσης υποστρώματος κασιίγαρου (80% γλυκόζη, 20% φρουκτόζη) C/N=120

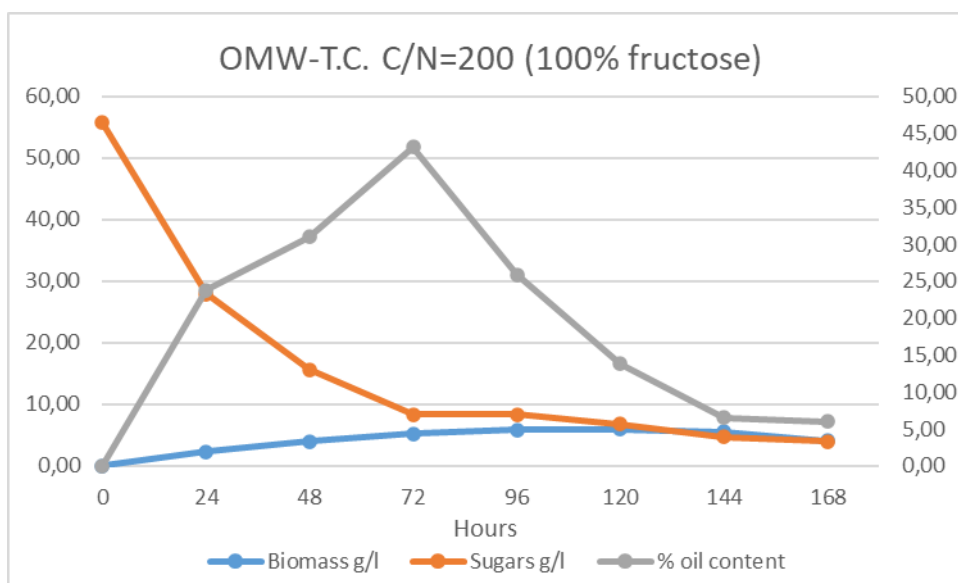


Γράφημα 4: Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασιίγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=60)

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

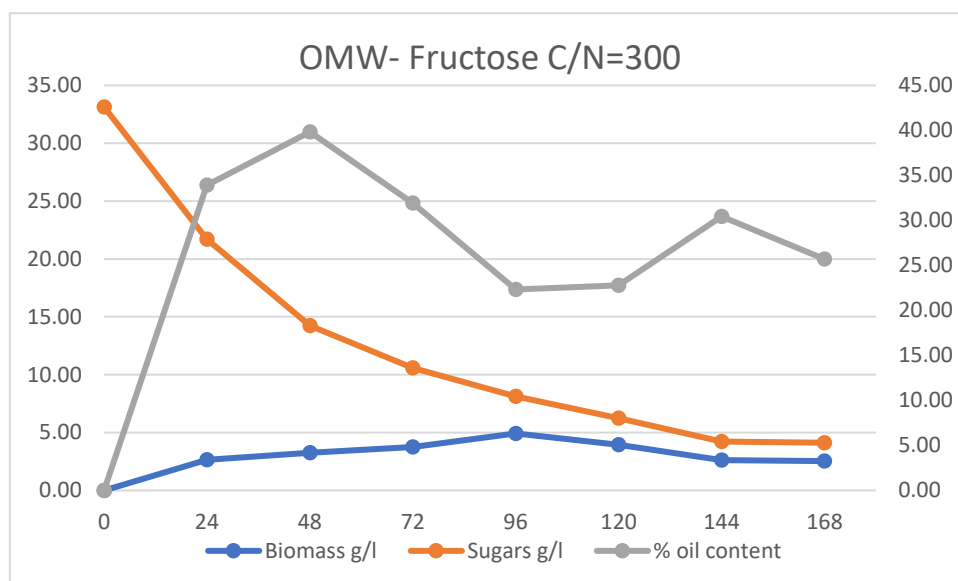


Γράφημα 5: Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασιόγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=120)

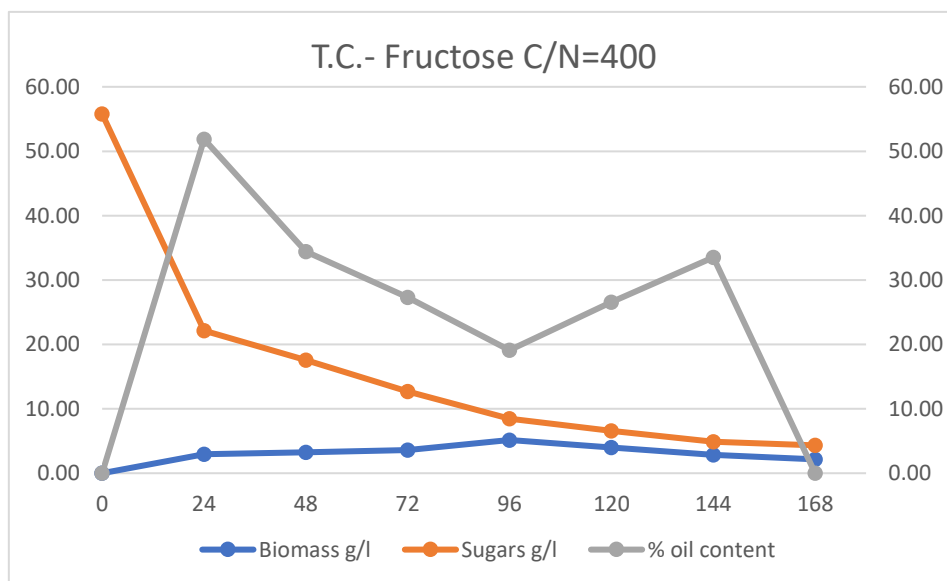


Γράφημα 6: Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασιόγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=200)

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

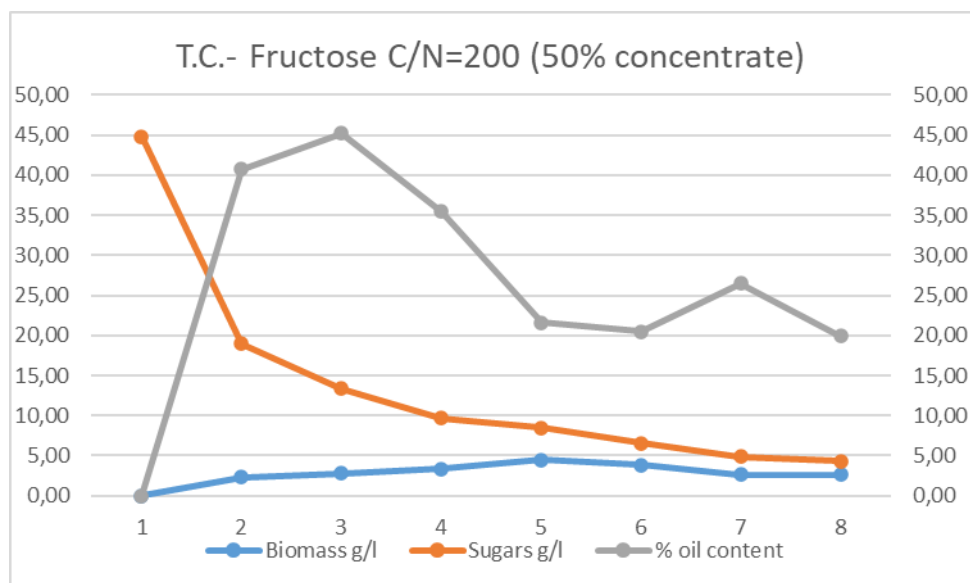


Γράφημα 7: Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασιόγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=300)



Γράφημα 8: Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασιόγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=400)

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»



Γράφημα 9: Καλλιέργεια T.C. EXF-8679 σε υπόστρωμα κασιίγαρου με προσθήκη φρουκτόζης 100% (C/N=200)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας κατέληξαν στα εξής συμπεράσματα:

- Μετά το screening σε πρότυπα σάκχαρα, ο μικροοργανισμός υπέδειξε μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας με χαμηλότερο % παραγόμενο μικροβιακό λίπος όταν κατανάλωνε γλυκόζη ενώ παρήγαγε μικρότερη βιομάζα- με ταυτόχρονη άνοδο του % παραγόμενου μικροβιακού λίπους όταν κατανάλωνε φρουκτόζη
- Ο μικροοργανισμός κατανάλωσε την λακτόζη και την γλυκερόλη αλλά παρήγαγε μικρή ποσότητα σε βιομάζα και καθόλου μικροβιακό λίπος (<1g/L).
- Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε δείγμα κασιίγαρου επιβεβαίωσε τα παραπάνω (σχετικά με την κατανάλωση σακχάρων)
- Η μέγιστη παραγωγή SCO σε υπόστρωμα κασιίγαρου ήταν 49.47% (C/N=400, 24 hours)
- Η μέγιστη παραγωγή SCO σε υπόστρωμα κασιίγαρου ήταν 2.23 g/L (C/N=200, 72hours)
- Η παρουσία φαινολικών ενώσεων είχαν προωθητικό ρόλο στον μεταβολισμό του κυττάρου για την παραγωγή μικροβιακού λίπους.
- Η παρουσία φαινολικών ενώσεων επηρέασε την παραγωγή των κυττάρων ως προς τον αριθμό τους καθώς η παραγόμενη βιομάζα μειώθηκε και οι συνθήκες στρες που δημιουργήθηκαν ώθησαν τον μεταβολισμό σε παραγωγή περισσότερου μικροβιακού λίπους.
- Η αύξηση του λόγου C/N στην ζύμωση είχε προωθητικό ρόλο ως προς την % παραγωγή μικροβιακού λίπους καθώς μειώθηκε η παραγόμενη βιομάζα.
- Η αύξηση της ποσότητας σακχάρων είχε αντιμικροβιακό χαρακτήρα για τον μικροοργανισμό
- Η παρουσία φαινολικών ενώσεων επηρέασε την μορφολογία των κυττάρων. Σε συνθήκες στρες οι μικροοργανισμοί συσσωματώθηκαν και παρήγαγαν πιο γρήγορα το μικροβιακό λίπος ως μέσο αποθήκευσης ενέργειας.
- Η αύξηση του φαινολικού φορτίου της ζύμωσης είχε αντιμικροβιακό χαρακτήρα για τον μικροοργανισμό.

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το συμπέρασμα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι ότι όταν ο ζυμομύκητας *trichosporon coremiforme* EXF-8679 καταναλώνει φρουκτόζη ως πηγή σακχάρου παράγει μεγαλύτερη ποσότητα σε μικροβιακό λίπος. Αντίθετα, όταν καταναλώνει γλυκόζη, τείνει να ωθεί τον μεταβολισμό του στην παραγωγή περισσότερης ποσότητας βιομάζας και λιγότερου μικροβιακού λίπους. Επίσης, ο μικροοργανισμός, δεν παρήγαγε ικανοποιητική ποσότητα βιομάζας, όταν καταναλώνει λακτόζη ή γλυκερόλη. Η μέγιστη παραγωγή SCO σε υποστρώμα κασίγαρου ήταν 49.47% (C/N=400, 24 hours) και 2.23 g/L (C/N=200, 72hours). Η παρουσία φαινολικών ενώσεων είχαν προωθητικό ρόλο στον μεταβολισμό του κυττάρου για την παραγωγή μικροβιακού λίπους.

ΠΕΡΕΤΑΙΡΩ ΕΡΕΥΝΑ

Η ένδειξη ότι ο μικροοργανισμός έχει μεγάλη % παραγωγή μικροβιακού λίπους σε υποστρώματα φρουκτόζης ανοίγει την οδό της πιθανότητας αξιοποίησης αποβλήτων συνδιαστικά. Παράδειγμα θα μπορούσε να αποτελέσει η επεξεργασία κασίγαρου συνδιαστικά με υποστρώματα πλούσια σε πηγή φρουκτόζης όπως τα απόβλητα βιομηχανίας χυμών. Ακόμα, τα αποτελέσματα τις έρευνας αποτελούν την βάση για την περεταίρω μελέτη ζύμωσης του κασίγαρου σε αυξητικές συνθήκες όγκου (Batch, Fed-batch) σε βιοαντιδραστήρα. Τέλος, επιλογή μπορεί να αποτελέσει για περεταίρω έρευνα η μελέτη καλλιέργειας σε άλλα υποστρώματα πλούσια σε φαινολικό φορτίο όπως οι οινολάσπες, λάσπες ζυθοποίησης, συνδιαστικά κ.α..

- Ποιοτικός προσδιορισμός λιπιδίων- Μέθοδο μεθυλεστεροποίησης- G.C.
- Συνδυαστική επεξεργασία αποβλήτων- Κασίγαρος- υποστρώματα πλούσια σε φρουκτόζη (π.χ. απόβλητα βιομηχανίας χυμών)
- Καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα- Μελέτη σε αυξητικές συνθήκες όγκου (Batch, Fed-batch)
- Καλλιέργεια σε λοιπά υποστρώματα-Μελέτη σε υποστρώματα σημαντικού φαινολικού φορτίου όπως οινολάσπες, λάσπες ζυθοποίησης, συνδυαστικά κ.α.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

"Genus Record Details-Trichosporon". Index Fungorum. CAB International. Retrieved 2010-04-30.

Abd EL-Aziz, A. B. E. D., A. A. E. N. Awad, and G. H. Zaki. "Reduction of olive oil mill waste water phenolic compounds and COD using *Paecilomyces variotii*." *Trends Ind. Biotechnol. Res* 1 (2015): 1-9.

Akar, Sibel Tunali, et al. "Biosorption of a reactive textile dye from aqueous solutions utilizing an agro-waste." *Desalination* 249.2 (2009): 757-761.

Alcaide, E. Molina, and A. Nefzaoui. "Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition." *International Biodeterioration & Biodegradation* 38.3-4 (1996): 227-235.

Athenaki, Maria, et al. "Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations." *Journal of Applied Microbiology* 124.2 (2018): 336-367.

Bambalov, G., C. Israilides, and S. Tanchev. "Alcohol fermentation in olive oil extraction effluents." *Biological wastes* 27.1 (1989): 71-75.

Blika, P. S., et al. "Anaerobic digestion of olive mill wastewater." *Global NEST Journal* 11.3 (2009): 364-372.

Boskou, Dimitrios, G. Blekas, and M. Tsimidou. "Olive oil." *Chemistry and Technology. Champaign, IL: AOCS* (1996).

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Brenes, Manuel, et al. "Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43.10 (1995): 2702-2706.

Budinova, T., et al. "Removal of arsenic (III) from aqueous solution by activated carbons prepared from solvent extracted olive pulp and olive stones." *Industrial & engineering chemistry research* 45.6 (2006): 1896-1901.

Cabrera, Francisco, et al. "Land treatment of olive oil mill wastewater." *International Biodeterioration & Biodegradation* 38.3-4 (1996): 215-225.

Chazau-Gillig, S. "The civilisation of olive trees and cereals." *Olivae* 53 (1994): 14.

Crognale, Silvia, et al. "Olive oil mill wastewater valorisation by fungi." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* 81.9 (2006): 1547-1555.

D'Annibale, Alessandro, et al. "Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production." *Bioresource technology* 97.15 (2006): 1828-1833.

de Graaff, Jan, and L. A. A. J. Eppink. "Olive oil production and soil conservation in southern Spain, in relation to EU subsidy policies." *Land use policy* 16.4 (1999): 259-267.

Di Giovacchino, L., et al. "Olive vegetable water spreading and soil fertilization." *IV International Symposium on Olive Growing* 586. 2000.

Dourou, Marianna, et al. "Bioconversion of olive mill wastewater into high-added value products." *Journal of Cleaner Production* 139 (2016): 957-969.

Filippousi, Rosanina, et al. "Isolation, identification and screening of yeasts towards their ability to assimilate biodiesel-derived crude glycerol: microbial production of polyols, endopolysaccharides and lipid." *Journal of applied microbiology* 127.4 (2019): 1080-1100.

Fiorino, P., and F. Nizzi Griffi. "The spread of olive farming." *Olivae* 44 (1992): 9-13.

Frankel, Edwin N. "Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality." *Food chemistry* 57.1 (1996): 51-55.

Guého E, de Hoog GS, Smith MT (1992). "Neotypification of the genus *Trichosporon*". *Antonie van Leeuwenhoek*. 61 (4): 285–288. doi:10.1007/bf00713937. PMID 1497333. S2CID 43889990.

Hamdi, Moktar. "Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion." *Applied biochemistry and biotechnology* 37.2 (1992): 155-163.

Isager, Signe, and Jens Erik Skydsgaard. *Ancient Greek agriculture: an introduction*. Routledge, 2013.

Israilides, C. J., et al. "Olive oil wastewater treatment with the use of an electrolysis system." *Bioresource Technology* 61.2 (1997): 163-170.

Justino, Celine IL, et al. "Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view." *Ecotoxicology* 21.2 (2012): 615-629.

Juszczak, Piotr, et al. "Biomass production by *Yarrowia lipolytica* yeast using waste derived from the production of ethyl esters of polyunsaturated fatty acids of flaxseed oil." *Industrial Crops and Products* 138 (2019): 111590.

Kapellakis, Iosif Emmanouil, Konstantinos P. Tsagarakis, and John C. Crowther. "Olive oil history, production and by-product management." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 7.1 (2008): 1-26

Kapellakis, Iosif Emmanouil, Konstantinos P. Tsagarakis, and John C. Crowther. "Olive oil history, production and by-product management." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 7.1 (2008): 1-26.

Kiourellis, A. "I Tehnologia Paragogis Elaioladou sti Lesvo kata tin Arhaiotita." *The Technology of Olive Oil Production in the Island of Lesvos in Antiquity*. Prefecture of Lesvos 148 (2005).

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Kurtzman, Cletus P. "Molecular taxonomy of the yeasts." *Yeast* 10.13 (1994): 1727-1740.

Liu, Xiaoyan, et al. "Novel two-stage solid-state fermentation for erythritol production on okara–buckwheat husk medium." *Bioresource technology* 266 (2018): 439-446.

Martinez-Garcia, Gregorio, et al. "Anaerobic treatment of olive mill wastewater and piggery effluents fermented with *Candida tropicalis*." *Journal of hazardous materials* 164.2-3 (2009): 1398-1405.

Martín-Lara, M. A., et al. "Multiple biosorption–desorption cycles in a fixed-bed column for Pb (II) removal by acid-treated olive stone." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18.3 (2012): 1006-1012.

McNamara, Christopher J., et al. "Bioremediation of olive mill wastewater." *International Biodeterioration & Biodegradation* 61.2 (2008): 127-134.

Melena, Jose L. "Olive oil and other sorts of oil in the Mycenaean tablets." *Minos: Revista de Filología Egea* 18 (1983).

Ministry of Agriculture of Greece, 2022

Ministry of Natural habitat and energy of Greece, 2022

Morgunov, Igor G., Svetlana V. Kamzolova, and Julia N. Lunina. "The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation." *Applied microbiology and biotechnology* 97.16 (2013): 7387-7397.

Niaounakis, Michael, and Constantinos P. Halvadakis. "Olive processing waste management: literature review and patent survey." (2006).

Obied, H. K., et al. "Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities." *Food and Chemical Toxicology* 45.7 (2007): 1238-1248.

Oikonomou, Evangelos, et al. "Dietary consumption of olive oil and cardiovascular outcome in patients with coronary artery disease." *Journal of the American College of Cardiology* 69.11S (2017): 146-146.

Papanikolaou, Seraphim, and George Aggelis. "Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production." *European Journal of Lipid Science and Technology* 113.8 (2011): 1031-1051.

Papanikolaou, Seraphim, and George Aggelis. "Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications." *European Journal of Lipid Science and Technology* 113.8 (2011): 1052-1073.

Rakicka, Magdalena, et al. "Two-stage continuous culture–technology boosting erythritol production." *Journal of cleaner production* 168 (2017): 420-427.

Rozzi, Alberto, and Francesca Malpei. "Treatment and disposal of olive mill effluents." *International biodeterioration & biodegradation* 38.3-4 (1996): 135-144.

Rywińska, Anita, et al. "Chemostat study of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*." *Journal of biotechnology* 152.1-2 (2011): 54-57.

Sarris, Dimitrios. "Biotechnological treatment of olive mill wastewaters-based media: production of added-value compounds with the use of strains of yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Saccharomyces cerevisiae*." (2015).

Sarris, Dimitris, and Seraphim Papanikolaou. "Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies." *Engineering in life sciences* 16.4 (2016): 307-329.

Stamatelatou, K., et al. "Anaerobic digestion of olive mill wastewater in a periodic anaerobic baffled reactor (PABR) followed by further effluent purification via membrane separation technologies." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* 84.6 (2009): 909-917.

Tchakouteu, S. S., et al. "Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency." *Journal of applied microbiology* 118.4 (2015): 911-927.

«Βιοτροποποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: υγρές καλλιέργειες ζυμομύκητα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

Thurmond, David L. "Olives." *A Handbook of Food Processing in Classical Rome*. Brill, 2006. 73-110.

Tomaszewska, Ludwika, Anita Rywińska, and Witold Gładkowski. "Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39.9 (2012): 1333-1343.

Tzirita, Markella, et al. "Effect of salt addition upon the production of metabolic compounds by *Yarrowia lipolytica* cultivated on biodiesel-derived glycerol diluted with olive-mill wastewaters." *Energies* 12.19 (2019): 3649.

Vasconcelos, Bruno, et al. "Oleaginous yeasts for sustainable lipid production—from biodiesel to surf boards, a wide range of “green” applications." *Applied microbiology and biotechnology* 103.9 (2019): 3651-3667.

Yangui, Thabèt, et al. "Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill wastewater as a natural disinfectant and its effect on seeds vigour response." *Food Chemistry* 117.1 (2009): 1-8.

Αγγελής, Γεώργιος. *Ολοκληρωμένη διαχείριση αποβλήτων ελαιουργιών με χρήση αυτόνομων και συνδυασμένων βιοτεχνολογικών μεθόδων επεξεργασίας*. Diss. Πανεπιστήμιο Πατρών. Σχολή Πολυτεχνική. Τμήμα Χημικών Μηχανικών, 2000.

Ηλιόπουλος, Ιωάννης, and Ειρήνη Κουρκουτά. "Κατασκευή σε εργαστηριακή κλίμακα μιας πιλοτικής εγκατάστασης επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιολιτριβείων." (2017).

Κωνσταντινόπουλος, Σωτήριος. "Διατροφική αξία και βιοδραστικές ουσίες του ελαιόλαδου και οφέλη για την υγεία." (2020).

Μάτσος, Ιωάννης-Δημήτριος. "Περιβαλλοντικές επιπτώσεις και μέθοδοι διαχείρισης υγρών αποβλήτων ελαιολιτριβείων." (2011).

Παυλέλλη, Λουίζα. "Παραγωγή και τυποποίηση ελαιόλαδου στη νήσο Λέσβο." (2020).

Χριστοφά, Μαρία. "Η ελαιοκαλλιέργεια στο νομό Λέσβου." (2015).